P. 4228

Ministère de l'Agriculture

Institut National de la Recherche Agronomique

COMPTES RENDUS ANNUELS DES TRAVAUX DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE

I. N. R. A.
SERVICE DE DOCUMENTATION
18. AVR. 1984
UNITE CENTRALE DE VERSAILLES

vol. 12
1983

INRA

Centre de Recherches d'AVIGNON

Domaine St Paul, 84140 Montfavet

(France)

Titre abrégé pour les citations : *C. R. Ann. Trav. Lab. Biochimie, 1979, 8.*

LB-12

Sommaire

Avant-Propos 3

COMPTE-RENDU SCIENTIFIQUE

Première Partie - **Biochimie Fondamentale.**

I - Induction croisée des tréhalases et des saccharases de l'Abeille.

I-1 - Induction d'une activité saccharase dans l'hémolymphe par une hyper-saccharosémie 5

I-2 - Formes moléculaires comparées des tréhalases, saccharases et pNP α-D-glucosidases 7

I-3 - Adaptabilité des α-glucosidases spécifiques de l'hémolymphe par transitions du coefficient de Hill 12

I-4 - Analyse mathématique des amortissements oscillatoires au cours de l'induction des tréhalases 14

I-5 - Variations des glucides et des saccharases sous hypertréhalosémie provoquée 16

I-6 - Induction à court terme des osidases par injection de tréhalose 17

I-7 - Projets de Recherches 19

II - Théorie stoechiométrique des enzymes coopératives.

II-1 - Application aux α-glucosidases d'Abeilles 20

II-2 - Application aux phosphatases d'Abeilles et de Végétaux 26

II-3 - Projets de Recherches 27

Deuxième Partie - **Biochimie Générale et Méthodologique.**

I-1 - Techniques cinétiques de compétition des substrats en enzymologie végétale 29

I-2 - Projets de Recherches 34

II-1 - Chromatographie nanoquantitative des pigments photosynthétiques 35

II-2 - Projets de Recherches 40

III - Recherche d'une méthode optimale d'extraction des pigments photosynthétiques et des phosphatases dans un même échantillon de feuilles 40

Incidences enzymologiques 42

IV-1 - Développement des techniques de chromatographie des glucides 43
IV-2 - Projets de Recherches 48
Troisième Partie - **Biochimie Thanatologique.**
I - Effets biochimiques sublétaux de pyréthroïdes chez l'Abeille 50
II - Effets biochimiques comparés du jeûne et d'une infection bactérienne chez le grillon 55
III - Effets biochimiques de la toxine du Bacillus thuringiensis sur les larves de Aedes aegypti 56
IV - Projets de Recherches 57
Quatrième Partie - **Biochimie Phyto-sémiologique.**
I - Caractérisation des traumatismes biochimiques végétaux.
I-1 - Etude des dismétabolismes consécutifs à un phénomène d'origine inconnue 60
I-2 - Inter-relations physiologiques normales et traumatiques 75
I-3 - Projets de Recherches 87
II - Mécanismes moléculaires anti-fongiques du Capsidiol.
II-1 - Action du Capsidiol sur la composition lipidique et protéique de membranes isolées de Phytophthora capsici 88
II-2 - Action du Capsidiol sur l'incorporation glucidique du Phytophthora 89
III - Expressions Biochimiques de la Résistance naturelle ou induite de Capsicum annuum au Phytophthora capsici
III-1 - Les concentrations glucidiques, en corrélation avec la sensibilité et la résistance de Capsicum annuum au Phytophthora capsici 90
III-2 - Les Pigments photosynthétiques et la résistance variétale ou induite de Capsicum au Phytophthora 93
III-3 - Mécanismes moléculaires d'action de l'éthyl--Phosphite d'aluminium sur la résistance de Capsicum au Phytophthora 94
III-4 - Projets de Recherches 95
Cinquième partie - **Activités Scientifiques Annexes et Fonctions d'Enseignement Supérieur.**

I - Charges d'expertises 98
II - Bibliographie 98
III - Fonctions honorifiques 98
IV - Enseignement supérieur 99
V - Conseil scientifique du Parc Naturel du Luberon ... 99

COMPTE RENDU ADMINISTRATIF

I - Exercice budgétaire 1983 100
II - Prévisions pour 1984 101
III - Effectifs et locaux : A - Situation actuelle 101
B - Demandes d'attributions . 102
IV - Difficultés 105

DOCUMENTS ANNEXES 107

PUBLICATIONS 1983 119

AVANT PROPOS

L'année 1983 a vu se préciser et s'affirmer la double orientation des programmes du Laboratoire de Biochimie :

◊ Biochimie thanatologique : chez les Insectes à protéger ou à combattre.

◊ Biochimie phyto-sémiologique : médiateurs moléculaires dans les fonctions de résistance des Végétaux (en collaboration avec la Faculté des Sciences d'Avignon), la ligne commune de ces deux directions étant la caractérisation des états d'équilibre biochimiques normaux et traumatiques.

Ces programmes continuent à être préparés et étayés par une activité de recherches plus fondamentales dont il convient de souligner certains aboutissements intéressants, dans le domaine de l'enzymologie.

Les collaborations extérieures se sont poursuivies avec, en particulier, un nouveau stage sabbatique du Professeur MORGAN (Univ. de Lancaster, G.B.), la suite des programmes en collaboration avec le Laboratoire de Pathologie des Invertébrés du Professeur VAGO, (Univ. de Montpellier) et l'aboutissement d'un important contrat avec le CNES, débouchant sur de nouveaux concepts de recherche écotoxicologique, dont la presse, la radio et la télévision ont relaté les premiers résultats. Le Laboratoire de Biochimie a également continué à accueillir, pour des périodes de durées variables, de jeunes chercheurs de l'Université d'Avignon, dans le cadre d'une collaboration de plus en plus étroite avec le Laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétales du Professeur COULOMB.

Certes, chacun des thèmes abordés a conduit à des résultats concrets suivis d'interprétations physiologiques débouchant sur de nouvelles hypothèses de travail, l'ensemble étant matérialisé par une dizaine de publications dans des revues scientifiques nationales et internationales.

Toutefois, -et c'est là que le bât blesse- tout le fonctionnement du Laboratoire, l'encadrement, ainsi que la préparation technique nécessaires à la réalisation et à l'exploitation des quelques

19.750 dosages chromatographiques et 650 cinétiques enzymatiques effectuées en 1983 (auxquelles il convient d'affecter un coefficient multiplicatif relatif aux diverses manipulations mathématiques correspondantes), reposent sur une équipe permanente INRA de ... **3 personnes seulement.**

Or, quel est l'objectif du Laboratoire pour les prochaines années ? Il s'agit avant tout, dans les limites des programmes actuels (qui ne pourront pas être étendues), de passer progressivement à un niveau de qualité scientifique de plus en plus élevé, par l'approfondissement de certains aspects précis des travaux, tels que : purification et identification de diverses molécules impliquées dans les mécanismes étudiés. Seul le travail d'une équipe parfaitement coordonnée, motivée et ... d'effectif suffisant, pourra le permettre. Le Laboratoire a déjà bénéficié, grâce à l'appui du Chef de Département de Phytopharmacie, d'un influx budgétaire très positif, y compris en équipement. Sa structure a été, malheureusement, de nouveau remise en cause, (pour des raisons extérieures) avec pour conséquences le blocage de son **extension** (pourtant **prévue** et matériellement **réalisable**) en **effectifs** et en **locaux.** Ceci ne fait que confirmer une évidence : "ne se développe que ce qui existe", d'où la lutte qui continue à être menée pour que soit définitivement reconnue l'autonomie complète de l'entité scientifique que constitue le Laboratoire de Biochimie.

Première Partie

BIOCHIMIE FONDAMENTALE

Aucun objectif de recherche orientée ne peut être poursuivi avec succès s'il ne s'appuie pas sur des connaissances fondamentales suffisantes dans le domaine précis auquel il s'applique. Les travaux suivants ont été développés dans cet esprit : ainsi, les recherches sur l'induction des osidases de l'Abeille, outre leur intérêt pour l'apiculture, débouchent sur un concept d'adaptativité des formes moléculaires enzymatiques, dont les conséquences sont à retenir pour l'étude des inductions de résistance des organismes animaux et végétaux à des effecteurs exogènes ou xénobiotiques. D'autre part, le concept du mécanisme moléculaire des enzymes coopératives décrit sous le titre de "théorie stoechiométrique" suggère que les associations de molécules d'enzymes en complexes fonctionnels peuvent interférer, dans certains cas, avec les spectres d'"isozymes" utilisés en génétique des populations, et superposer une variabilité d'origine écophysiologique (inductible) à la variabilité strictement génétique.

I - INDUCTION CROISEE DES TREHALASES ET DES SACCHARASES DE L'ABEILLE.

Dr. BOUNIAS (L.B.C.) et Dr. M.R.J. MORGAN (Prof. of Molec. Enzymology, Univ. Lancaster - G.B.).

I-1 - **Induction d'une activité saccharase dans l'hémolymphe par une hyper-saccharosémie d'origine alimentaire** (publication : Comp. Biochem., 1984, sous presse).

L'administration en continu de saccharose 2M à de jeunes Abeilles provoque une rapide élévation (en 24 à 48 heures) des tréhalases et des saccharases (déterminées à partir de leurs substrats spécifiques respectifs, selon MORGAN, 1975, Insect Biochem., 5, 251-254). Une chute de ces activités est observée au 5e jour : elle coïncide avec un pic de concentration en glucose et fructose (qui en sont des rétro-inhibiteurs). Dès le 7e jour, alors que les tréhalases fluctuent autour de leur valeur moyenne normale, les saccharases augmentent de nouveau considérablement (plus de 40 fois la valeur initiale) et de manière continue. L'action du chloramphénicol, un inhibiteur mitochondrial des protéines de l'insecte, diminue de près de 50% l'amplitude

de la phase initiale d'augmentation des tréhalases mais n'affecte pas celle des saccharases (To+24h). Par contre, après 48h, le phénomène est exactement inversé. Après le 5e jour, l'augmentation d'activité des saccharases est à la fois retardée et réduite.

Ceci suggère que la 1ère phase d'induction comporte un réarrangement moléculaire conférant aux tréhalases pré-existantes une activité saccharasique accrue, tandis que la 2e phase correspond à une induction plus spécifique de l'activité de type saccharase.

Il est intéressant de noter qu'il s'établit entre les concentrations en saccharose (substrat inducteur) et en saccharase, une relation de type inverse (fig. 1) paraissant indépendante de l'action de l'inhibiteur (voir chapitres suivants).

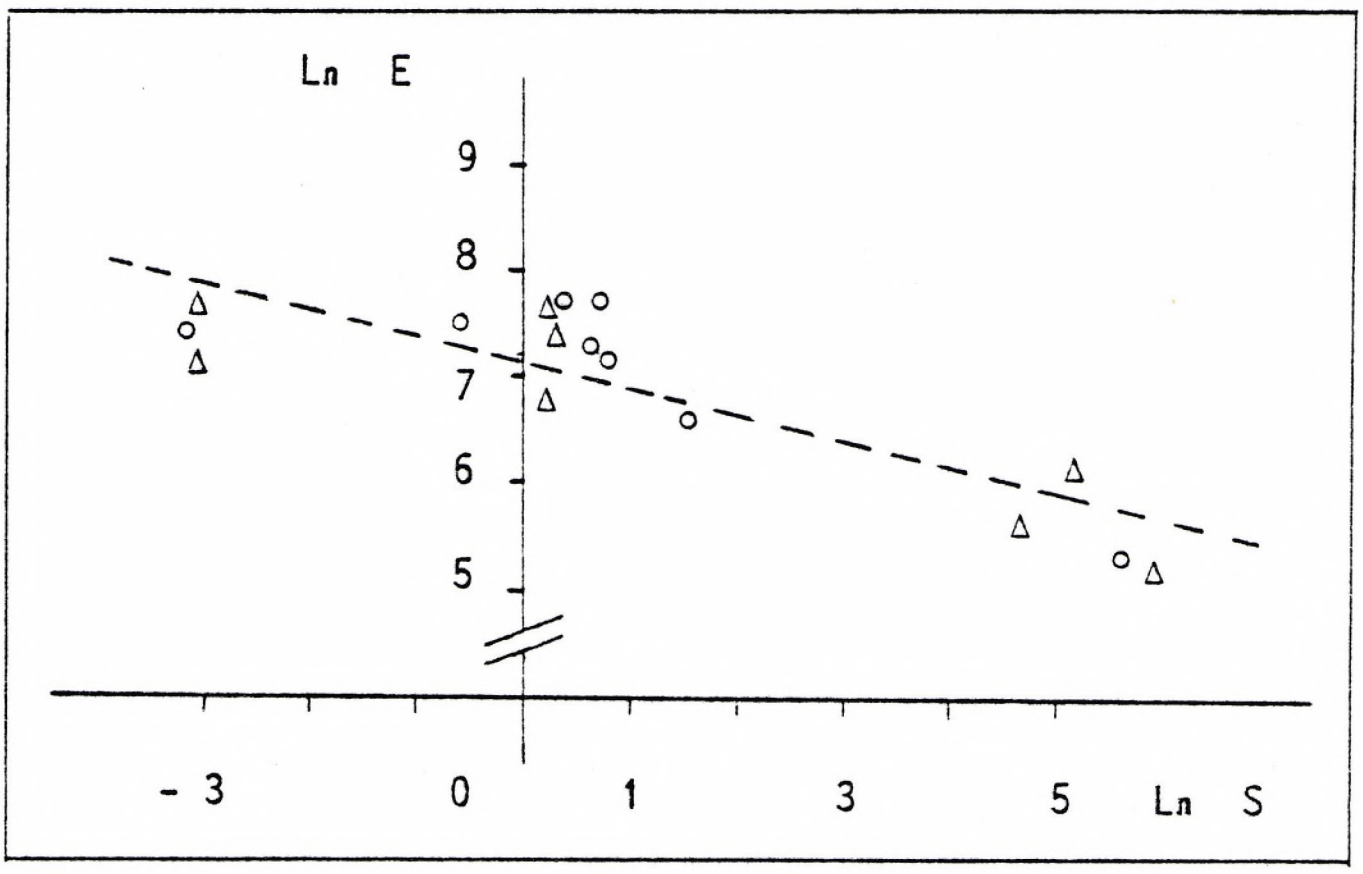


Fig. 1 - Expression en coordonnées bi-logarithmiques des relations entre les concentrations de l'enzyme (E=saccharase) et celles de son substrat (S=saccharose). Résultats obtenus en l'absence (-o-) ou en présence (Δ) d'inhibiteur de synthèse protéique.

La relation se traduit en coordonnées bilogarithmiques par : une forte corrélation négative : pour N=16 couples, $\rho = -0,820$. $Ln^E = -0,233\ LnS + 7,11$ ce qui correspond à une équation du type : $S=(C/E)^n$ dans laquelle : S=[saccharose] ; E=[saccharase] ;

C=1.224 µM/min/µl d'hémolymphe et n=4,29.

L'ensemble des phénomènes observés est interprété sur la base du schéma physiologique général de la fig. 2.

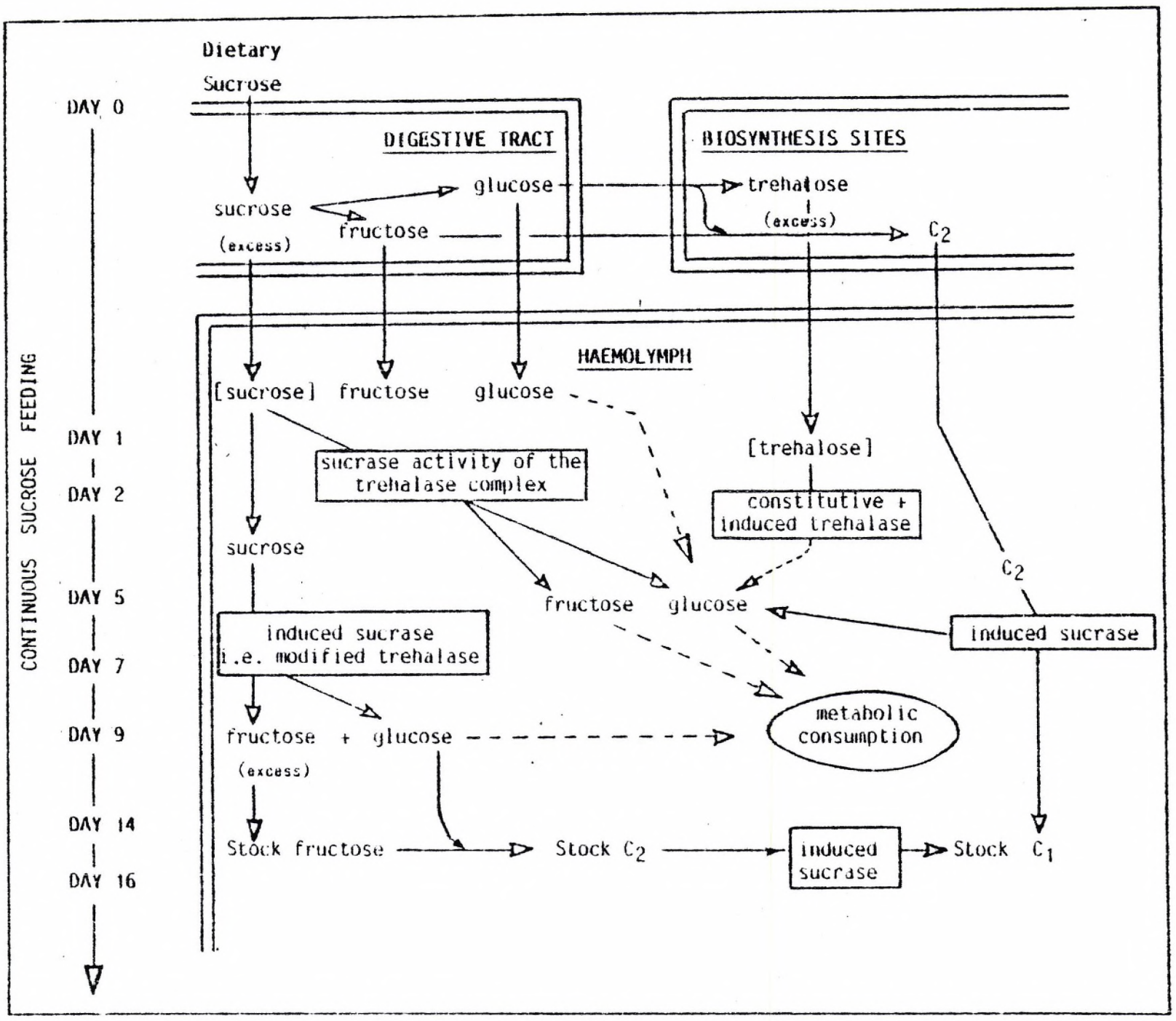


Fig. 2 - Schéma interprétatif des relations entre l'induction des osidases et les concentrations en substrats glucidiques chez l'Abeille.

I-2 - Formes moléculaires comparées des tréhalases, saccharases et pNP α-D-glucosidases de l'hémolymphe d'Abeilles après induction par la saccharose ou le tréhalose per os. (Publication: C.R. Soc. Biol., 1983, **177**(6), sous presse).

Les travaux précédents ont attiré l'attention sur la possibilité d'interactions structurales entre les saccharases et les tréhalases. Il convenait donc de comparer les formes moléculaires respectives de ces deux types d'activités, après induction par leurs substrats respectifs, aux formes naturelles présentes initialement chez l'Abeille

naissante, hors de toute influence artificielle.

Enfin, compte tenu des travaux déjà réalisés avec le pNP α-D-glucopyranoside, comme substrat artificiel favorable aux analyses cinétiques, il était également nécessaire de situer l'activité enzymatique correspondante par rapport aux formes moléculaires enzymatiques traitant respectivement le tréhalose et le saccharose.

Les spectres électrophorétiques initiaux sont indiqués sur la fig. 3.

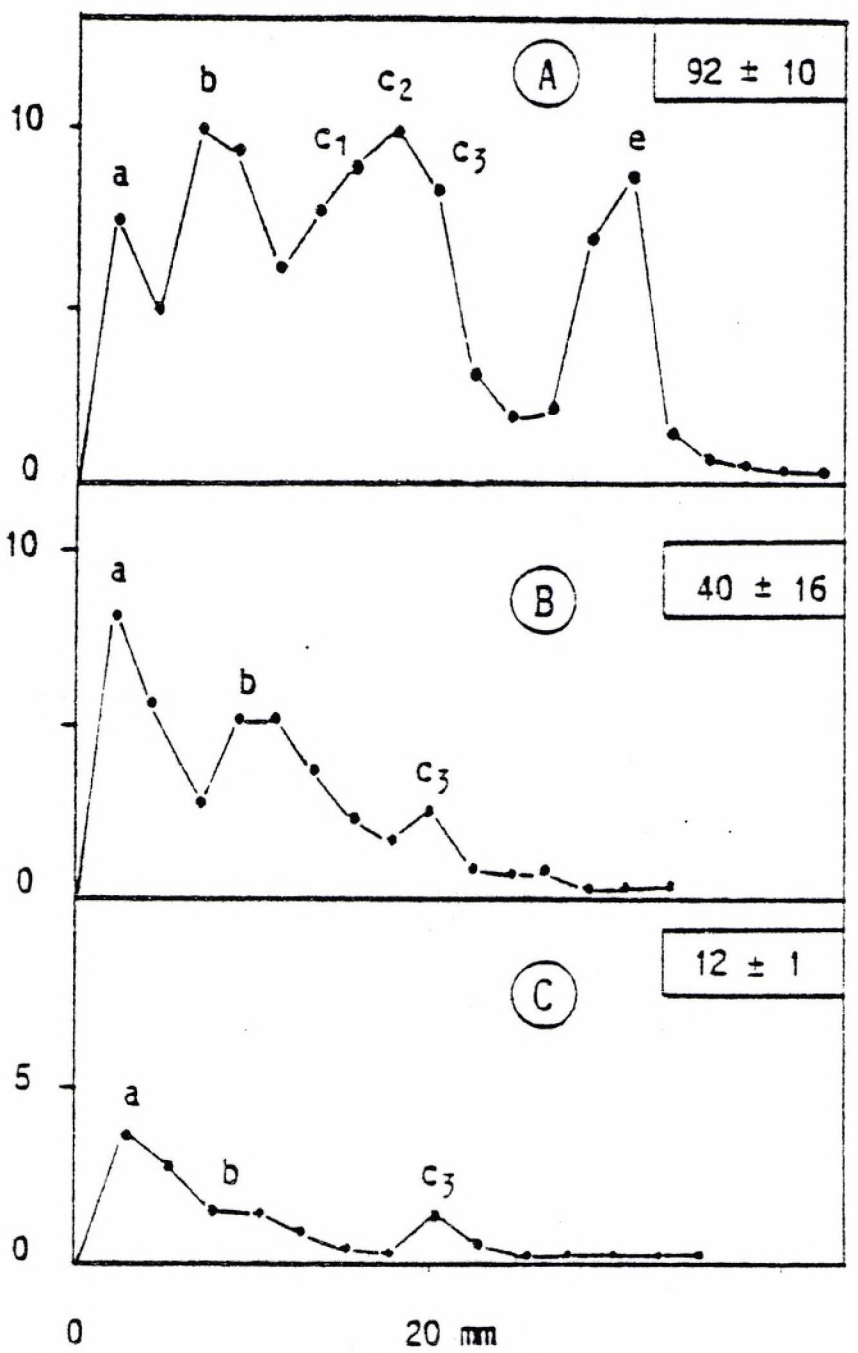


Fig. 3 - Formes moléculaires initiales des tréhalases naturelles d'abeilles naissantes : activités vis-à-vis du tréhalose A du saccharose B et du pNP α-D-glucoside C utilisés comme substrats in vitro. Les mobilités électrophorétiques sont indiquées en abscisse par les distances de migration dans les gels (mm). Les activités sont portées en ordonnée en unités arbitraires. L'activité totale des fractions, indiquée en encadré, est exprimé en $\mu M.min^{-1}.\mu l^{-1}$.

Le tréhalose étant le seul substrat naturel initial, l'activité osidasique de l'hémolymphe semble devoir être nécessairement constituée d'un complexe tréhalasique. Celui-ci comporte au moins 6 fractions dont trois : (a), (b) et (c3) sont également actives sur le saccharose et sur le substrat artificiel (en leur absence, évidemment).

Ces 3 fractions paraissent donc constituer la partie la moins spécifique du complexe tréhalasique, et leur activité est très normalement plus faible que celle du complexe tréhalasique complet. L'administration orale de saccharose 2M induit une augmentation considérable (30 fois) de l'activité des fractions (a) et (c) vis-à-vis du saccharose (fig. 4).

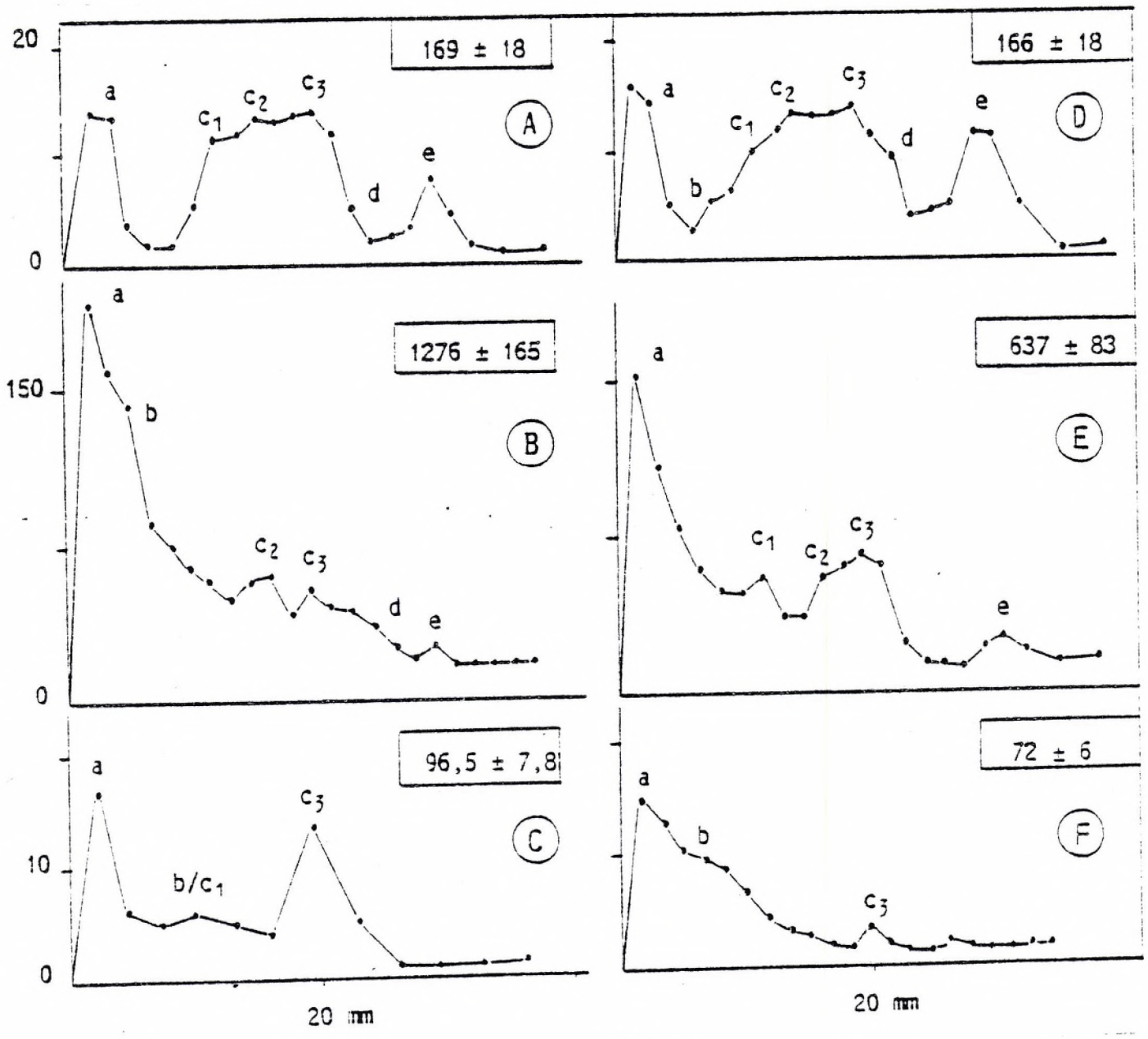


Fig. 4 - Formes moléculaires des osidases de l'hémolymphe d'abeilles ayant reçu du saccharose 2M seul A B C ou en présence de chloramphénicol 1,6 mM D E F . A D : tréhalases ; E B : saccharases ; C F : pNP α-D-glucosidases. Les coordonnées sont identiques à celles de la figure .

Le chloramphénicol (0,3 mM) réduit de 50% ce phénomène, ce qui se traduit par un doublement de la valeur de la tréhalosémie. Les fractions (a) et (b) diminuent alors au profit de la fraction (c_3). L'activité pNP α-D-glucosidase est également affectée, mais c'est la fraction c_3 qui diminue au profit de la fraction (b). En revanche, le complexe tréhalasique est peu affecté quantitativement, mais il perd la fraction (b) ...

Ces résultats paraissent confirmer l'hypothèse du réarrangement d'un même complexe tréhalasique, puisque :
a) les tréhalases initiales (natives) ont des composants saccharasiques
b) l'induction des saccharases s'accompagne d'une forte activité tréhalasique, y compris sous la forme de ses composants les plus spécifiques du tréhalose.

Il est important de constater, à l'inverse, que le complexe tréhalasique induit par une forte hypertréhalosémie, en l'absence **totale** de saccharose, recèle une très forte activité saccharasique dans laquelle la fraction (b) conserve, après action du chloramphénicol, une part importante qu'elle perd dans l'activité tréhalasique au profit d'une fraction (d) de plus grande mobilité (fig. 5).

Cette observation est à rapprocher du spectre saccharasique induit par le saccharose, ce qui peut suggérer l'action d'un inducteur secondaire présentant quelque analogie structurale avec le saccharose: or, les analyses que nous avons effectuées aux stades adéquats ont révélé la présence d'une quantité appréciable (9mM) d'un diholoside de type gluco-fructoside aux propriétés chromatographiques concordant avec celles du mélézitose : il pourrait s'agir là d'un **"inducteur putatif".**

D'autre part, les fractions (a) et (b) induites par le tréhalose, présentent également une forte activité pNP α-D-glucosidasique, ce qui confirme leur caractère de moindre spécificité. Le chloramphénicol agit alors en réduisant l'importance relative de la fraction (a).

L'ensemble de ces analyses suggère plusieurs hypothèses quant à l'origine cellulaire des formes moléculaires concernées (rappelons que les mitochondries de l'Abeille contiennent une importante "réserve" de

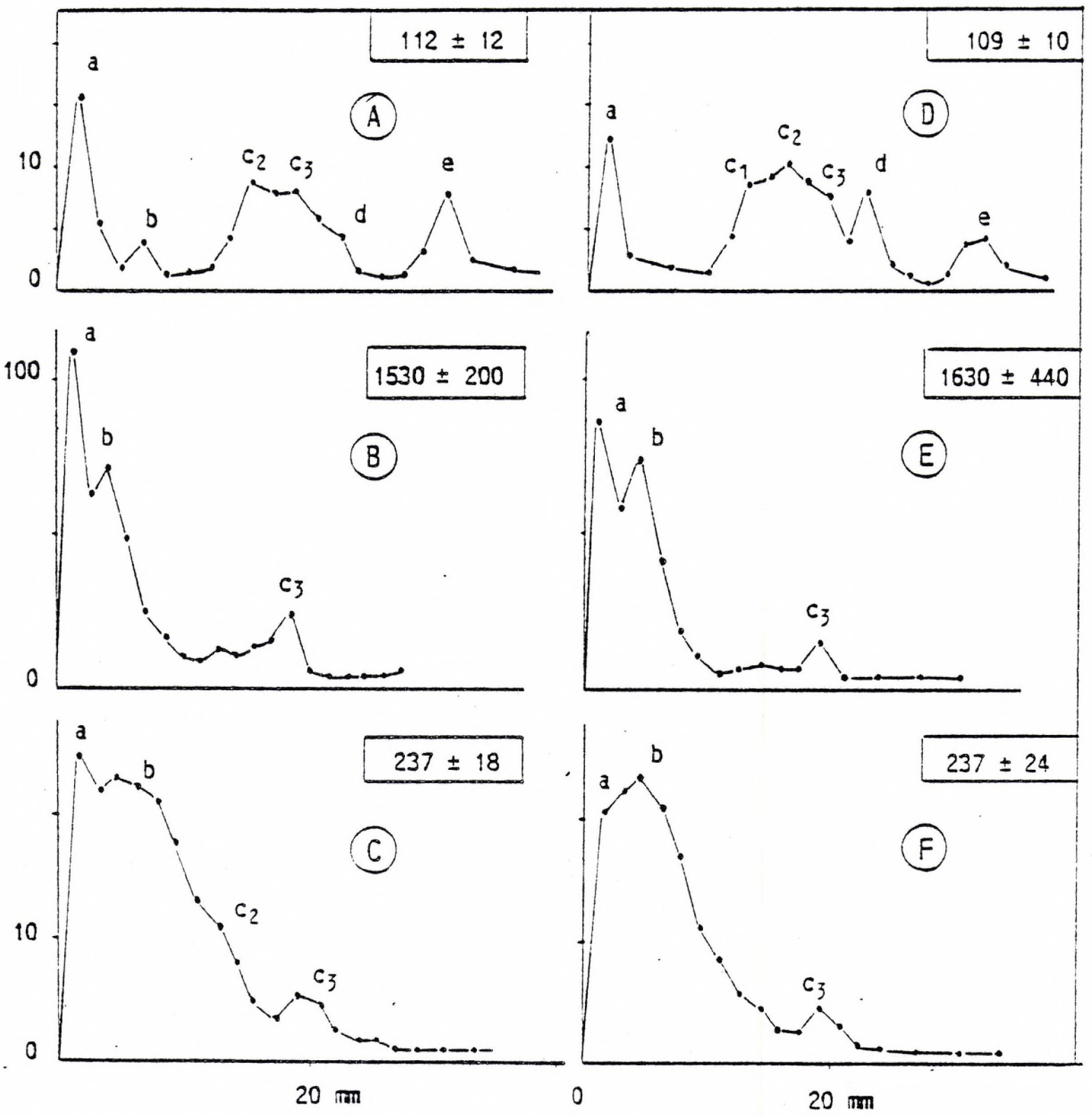


Fig. 5 - Formes moléculaires des osidases de l'hémolymphe d'abeille ayant reçu du tréhalose 1M seul A B C ou en présence de chloramphénicol 1,6 mM D E F . A D : tréhalases ; E B : saccharases: C F : pNP α-D-glucosidases. Les coordonnées sont identiques à celles des figures 1 et 2.

C

de molécules de tréhalase : TALBOT et al., 1975, Can. J. Biochem., 53, 1106-1117). Toutefois, l'idée principale qui s'en dégage est celle de l'existence d'un complexe tréhalasique dont certaines formes, au prix d'un ré-arrangement moléculaire (pouvant être commandé par une enzyme, donc sensible à un inhibiteur de synthèse protéique), acquièrent en fonction des besoins physiologiques une activité accrue sur d'autres substrats, d'origine exogène (saccharose) et même artificiels (pNP α-D-glucoside).

L'un des objectif suivants était donc de caractériser et comparer les propriétés cinétiques respectives des 3 activités concernées : tréhalase, saccharase et pNP α-D-glucosidase.

I-3 - Adaptativité des α-glucosidases spécifiques de l'hémolymphe d'Abeilles aux nécessités physiologiques par transitions du coefficient de Hill. (Publication : International Journal of Biochemistry, 1983-84, n°761 : sous presse).

Les propriétés cinétiques respectives spécifiques des tréhalases et des saccharases ont été déterminées par deux voies différentes.

◊ D'une part d'après la méthode directe : v=f(S) : les représentations d'**Augustinsson** (fig. 6 A et D) suggèrent déjà une manifestation opposée de la coopérativité dans les deux cas. Les courbes de **Hanes** (fig. 6 B et E) permettent d'estimer assez correctement le paramètre (V_M) par la valeur vers laquelle tend la pente de la courbe lorsque S tend vers l'infini. Les droites de **Hill** (fig. 6 C et F) donnent, enfin, les valeurs des paramètres (K) et (n).

La constante de dissociation apparente mesurée dans le cas du tréhalose est très inférieure à celle relative au saccharose, ce qui concorde avec la finalité première de l'enzyme. Les coefficients de Hill s'écartent très significativement de l'unité. Leurs valeurs ont toutefois été vérifiées :

◊ D'autre part, par la méthode de compétition des substrats. Les paramètres sont d'abord établis avec le substrat artificiel (pNP α-Glc), qui permet l'utilisation de la méthode algébrique rigoureuse (BOUNIAS, 1979, Comp. Biochem., 63B, 407-417). Les résultats, déjà publiés par ailleurs, montrent que les paramètres de l'activité pNP α-D-glucosidase se rapprochent plutôt de ceux des saccharases ($V_M \simeq 4$ µM/mn ; $K \simeq 2,5$; $n \simeq 0,9$). Du saccharose ou du tréhalose sont ensuite incorporés dans le milieu réactionnel où ils entrent en compétition avec le pNP α-D-Glc, et permettent l'application de l'équation de CHOU pour les inhibiteurs compétitifs non michaëliens : $[v_o/v_i - 1] = (I/I_{50})^{ni}$.
Les résultats obtenus pour les valeurs de ni sont respectivement :

- action du tréhalose : ni = 1,43
- action du saccharose: ni = 0,656

Le complexe tréhalasique manifeste une coopérativité apparente positive ($n=1,41 \pm 0,17$: $P < 0,05$) et le complexe saccharasique une

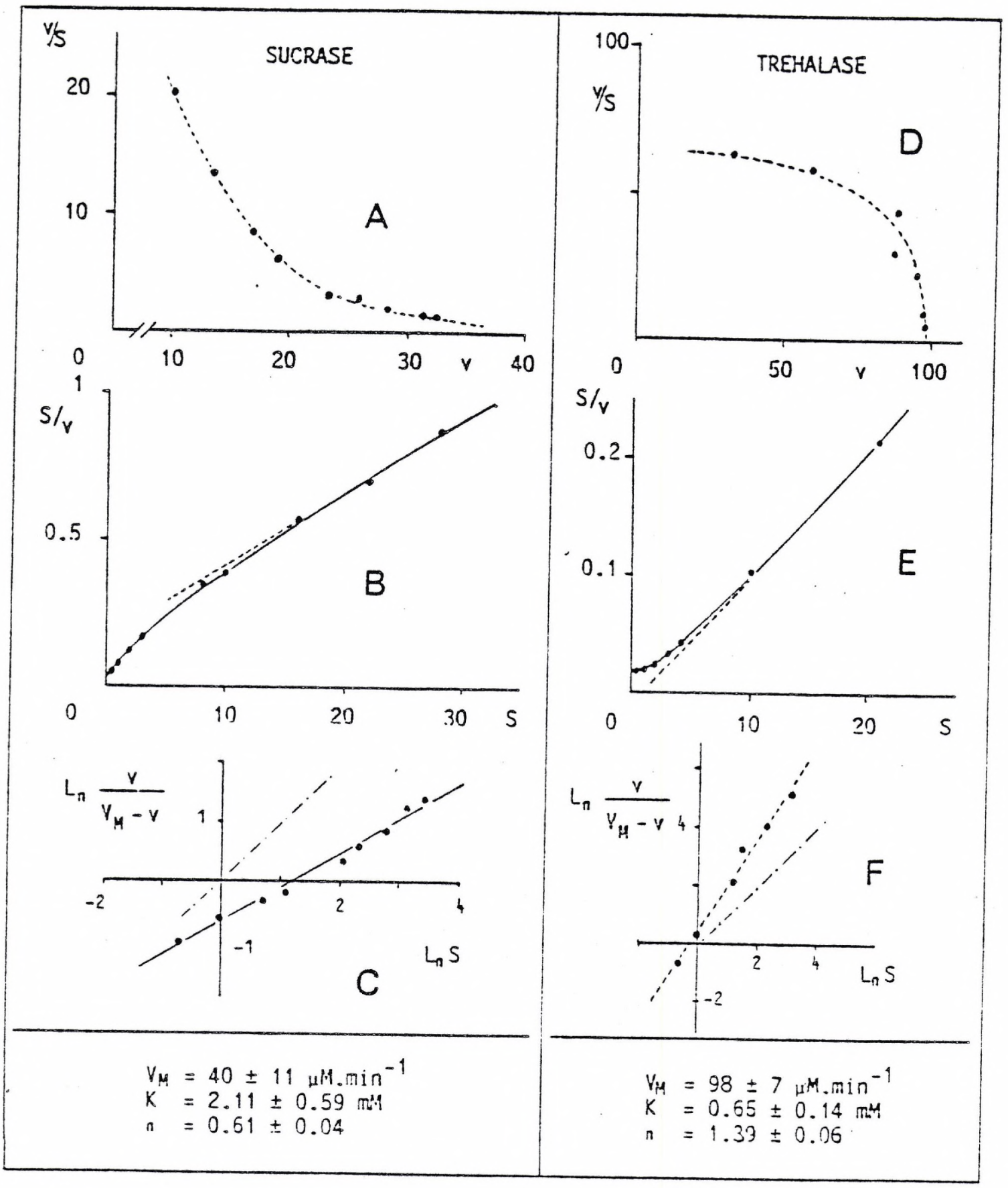


Fig. 6 - Analyse des paramètres cinétiques des saccharases et des tréhalases d'Abeilles en coordonnées transformées de AUGUSTINSSON (A et D), de HANES (B et E) et de HILL (C et F), et résultats numériques.

coopérativité négative ($n=0,63 \pm 0,20$: $P < 0,05$).

Il est permis de se demander si la distribution de ces valeurs autour de l'unité ($1+0,4$ et $1-0,4$) est une simple coïncidence ...

La notion de coopérativité variable (déjà démontrée chez l'Abeille pour une même préparation enzymatique : c.f. BOUNIAS, 1982, Biochem.

Pharmacol., **31**, 2769-2775) associée à la disposition particulière des molécules de l'enzyme en complexes fonctionnels, telle que la suggère l'ensemble de ces résultats, vient étayer la "théorie stoechiométrique" dont les bases ont été également publiées à la fin de 1983 (cf. chap.II ci-après).

I-4 - Analyse mathématique des amortissements oscillatoires observés au cours de l'induction des tréhalases par le tréhalose dans l'hémolymphe d'Abeilles. (Publication en cours : IRCS Med. Sci. : Key Rep. in **Mol. Cell. Biol.** en collaboration avec le Dr. DEMONGEOT. Institut de Mathématiques Appl., Université de Grenoble.

Dans l'hémolymphe d'Abeilles recevant soit du tréhalose, soit du saccharose per os, la concentration en tréhalose subit des fluctuations dont nous avons pu établir la relation avec l'activité des tréhalases spécifiques. S'agissant d'un phénomène apparenté à l'induction, les expériences ont été répétées en présence du chloramphénicol. Les résultats sont illustrés par les figures 7 et 8.

Il s'agit là d'un phénomène caractéristique de chronobiologie dont nous avons ébauché l'interprétation mathématique.

La relation tréhalase : f(tréhalose) étant considérée comme le plan de phase d'un système dynamique, les lignes pointillées sur les fig. 7 et 8 sont les trajectoires des points représentatifs de ce système. L'équation du phénomène : $y = f(x)$ se décompose en un système différentiel tel que :

$$dx/dt = a_1 - Ky \frac{x^n}{1+x^n} \quad \text{(dynamique du substrat)}$$

$$dy/dt = K'x - a_2 y \quad \text{(dynamique de l'enzyme)}$$

a_1 = constante de vitesse de consommation de saccharose

$K'x$ = induction de tréhalase

$-a_2 y$ = catabolisme de la tréhalase.

En supposant, par simplification, que $n \simeq 1$, il est possible d'obtenir des amortissements oscillatoires si et seulement si les conditions suivantes sont observées:

$$A = \left[a_2 - \frac{K^2 a_1}{(1+\sqrt{1+K^2})(1+K) + K} \right]^2 - \frac{4K a_1 a_2}{1 + \sqrt{1+K^2}} < 0$$

(Dans ce système : $K = 2KK'/a_1 a_2$)

La condition est remplie si K est suffisamment grand et si $a_2 < a_1 < 5a_2$.

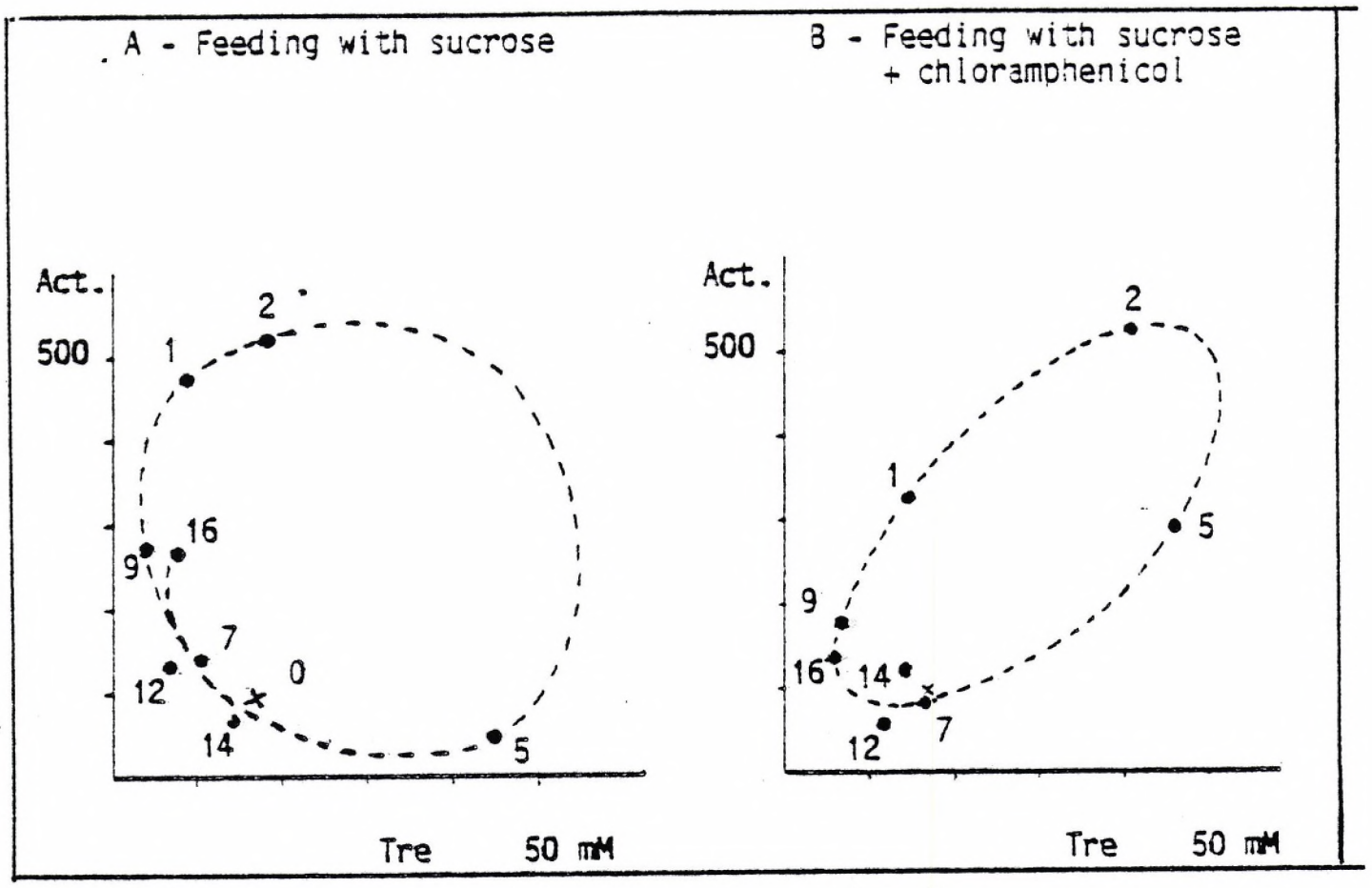


Fig. 7 - Variations cycliques de l'activité tréhalasique (Act.=$\mu M.mn^{-1}.\mu l^{-1}$) en fonction des concentrations en tréhalose (Tre) dans l'hémolymphe d'Abeilles recevant du saccharose per os, seul (A) ou avec inhibiteur de synthèse protéique (B). Les nombres figurant le long des pointillés indiquent la durée du traitement.

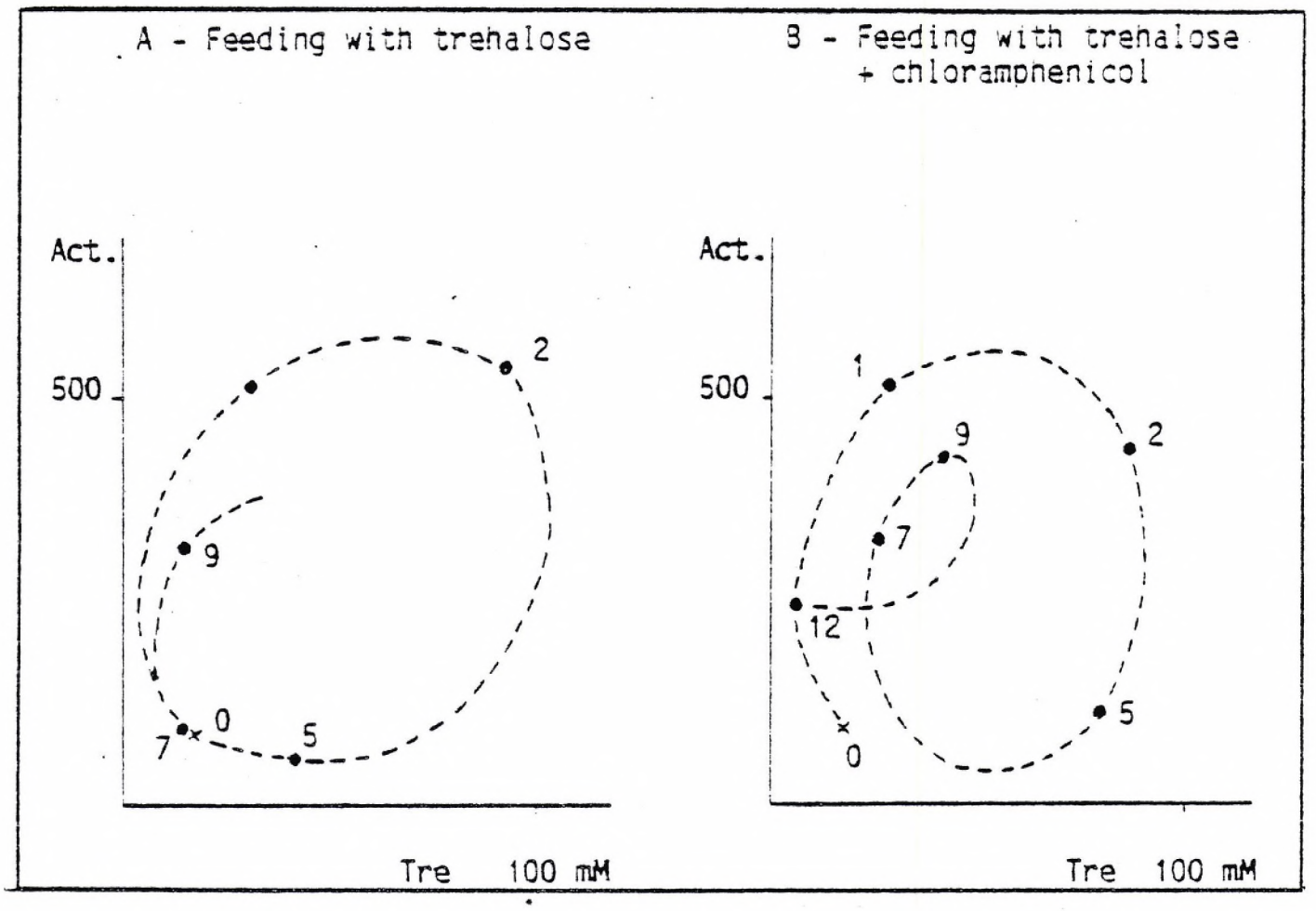


Fig. 8 - Variations cycliques de l'activité tréhalasique (Act.=$\mu M.mn^{-1}\mu l^{-1}$) en fonction des concentrations en tréhalose (Tre) dans l'hémolymphe d'Abeilles recevant du tréhalose per os, seul (A) ou avec inhibiteur de synthèse protéique (B). Les nombres figurant le long des pointillés indiquent la durée du traitement.

La "période"" des oscillations amorties est donnée, en première approximation, par : $2\pi/Im$, avec Im défini par $2\,Im=VA$.

Si K est assez grand, l'expression 2 Im se comporte de la même manière que l'expression : $[4\,a_1\,a_2 - (\frac{K.a_1}{1+K} - a_2)^2]$. Cette dernière est une fonction décroissante de K', d'où il ressort que la "période" décroît lorsque K' décroît, ce qui correspond aux résultats illustrés par la fig. 1.

I-5 - Variations des glucides et des saccharases de l'hémolymphe d'Abeilles sous hypertréhalosémie provoquée par le tréhalose per os. (Publication en cours : IRCS Med. Sci. K.R. Mol. Cell. Biol.).

Cette analyse particulière confirme la participation possible de diholosides secondaires, résultant de l'activité glucosyl-transférase des tréhalases d'Abeilles (1)(2) aux mécanismes adaptatifs observés.

Les deux composants supplémentaires contiennent chacun une molécule de glucose et une molécule de fructose. L'étude comparée de leurs propriétés chromatographiques relativement à celles d'étalons, avec différents systèmes d'élution, permet de suggérer les structures suivantes :

Composé c_1 = soit Glc $\alpha(1 \rightarrow 3)$ Fru
soit Glc $\alpha(1 \rightarrow 4)$ Fru

Composé c_2 = Glc $\alpha(1 \rightarrow 3)$Fru $\beta(2 \rightarrow 1)\alpha$Glc

Le composé c_1 a son maximum en même temps que le fructose tandis que le pic de c_2 coïncide avec celui du glucose et avec la phase la plus importante d'induction non chloramphénicol-dépentante des saccharases.

Le complexe tréhalasique induit par hypertréhalosémie semble donc être partiellement converti en formes d'activité saccharasique avant d'être catalisé.

(1) TAKENAKA et al., 1976, Bull. Fac. Agric. Tamagawa Univ., **16**, 194
(2) HUBER et al., 1976, Can. J. Biochem., **54**, 153-164.

I-6 - Induction à court terme des diosidases de l'hémolymphe d'Abeilles par injection de tréhalose. (Publication en cours de soumission).

L'injection de 0,5 µl de tréhalose 1 M permet de doubler la tréhalosémie de l'Abeille à l'instant To. La glycémie, les saccharases et les tréhalases ont été suivies à To + 2h, 4h, 6h, 8h, 16h. La tréhalosémie est rapidement ramenée à des oscillations autour de la valeur naturelle initiale (fig. 9), sauf en présence d'inhibiteur de synthèse protéique (chloramphénicol) où elle se maintient pendant 8h à un niveau très élevé voisin du double de la normale : ceci suggère que le chloramphénicol réprime l'induction de tréhalase : c'est ce que confirment les résultats présentés sur la fig. 10. Néanmoins, le premier pic enzymatique, observé à To + 2h est imputable aux saccharases, alors que le pic des tréhalases n'apparaît qu'à To + 6h. Dans les deux cas, l'injection simultanée de chloramphénicol (1 mM) supprime l'induction qui est retardée de 4 à 6 heures.

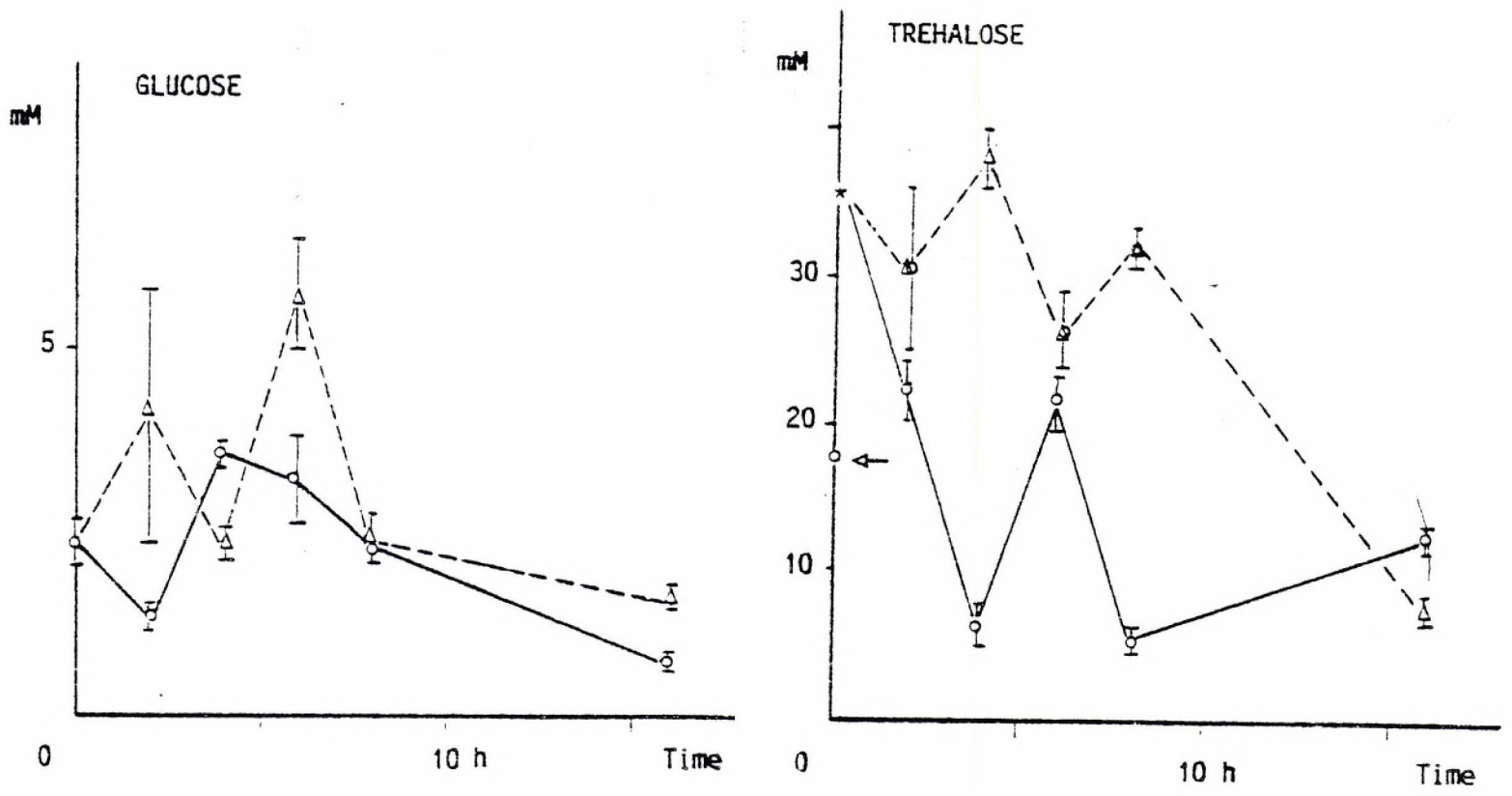


Fig. 9 - Variations de la tréhalosémie et de la glucosémie de l'Abeille après injection de tréhalose (+16 mM final) in vivo .

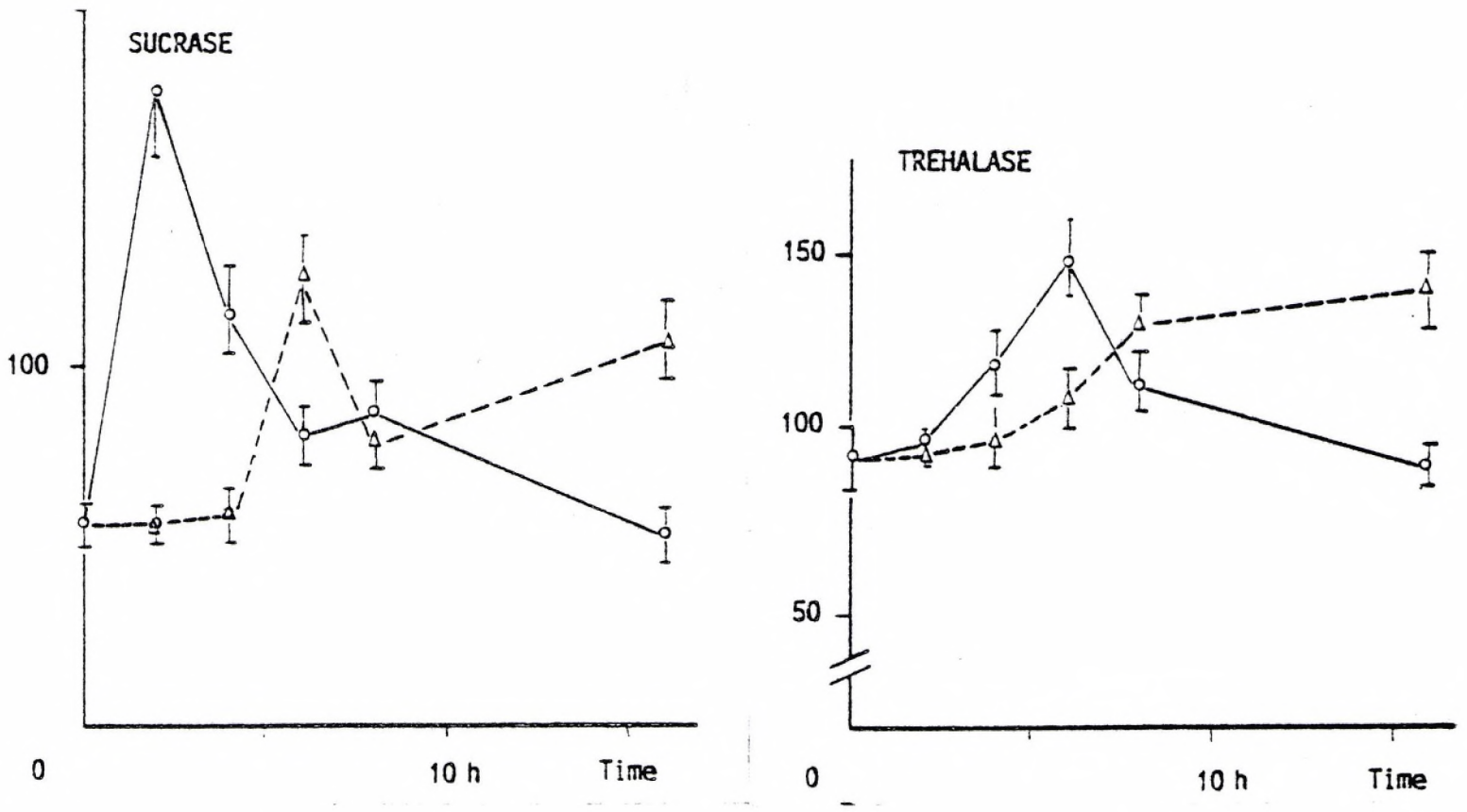


Fig. 10 - Variations d'activité ($\mu M.mn^{-1}.\mu l^{-1}$) des tréhaloses et des saccahrases d'Abeilles après injection de tréhalose in vivo.

Le glucose, comme produit de l'action de la tréhalase sur son substrat (tréhalose) est en relation avec l'activité de l'enzyme selon un mécanisme de type chronobiologique comme le montre la fig. 11.

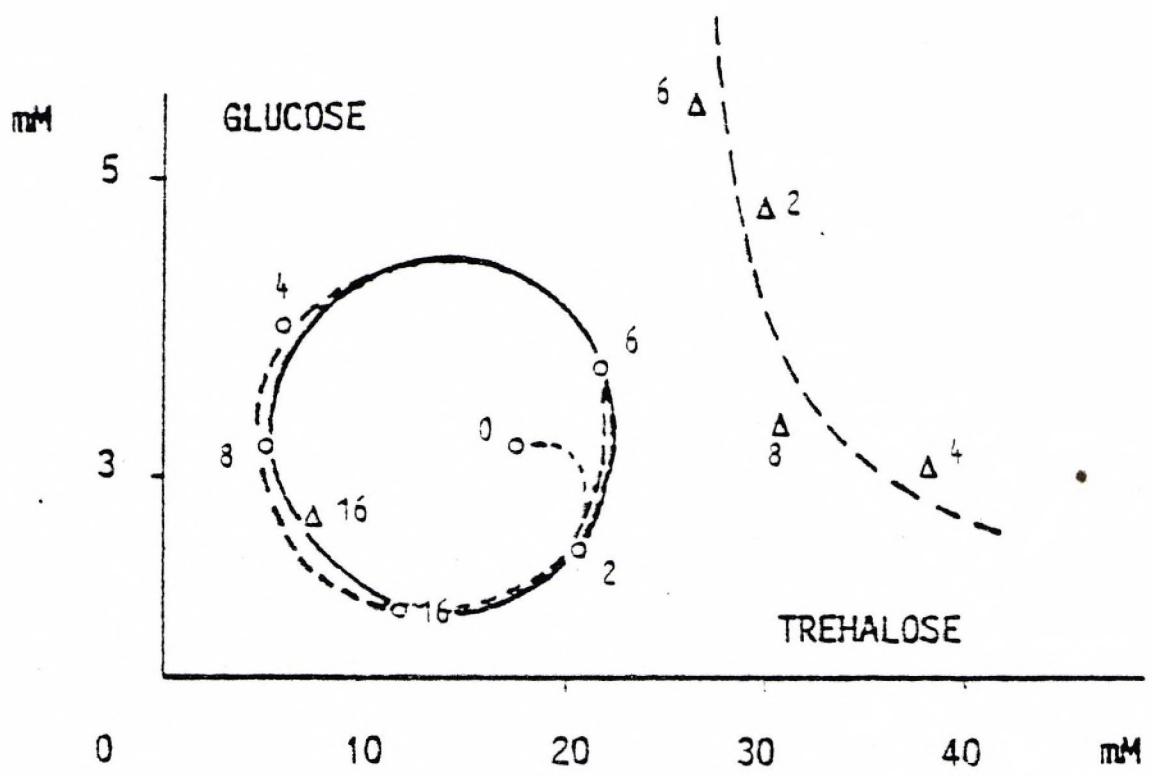


Fig. 11 - Variations relatives des concentrations du produit (glucose) et du substrat (tréhalose) des tréhalases de l'hémolymphe d'Abeilles après injection de tréhalose seul (o) ou en présence de chloramphénicol (Δ).

Il s'agit, de nouveau, d'un phénomène d'amortissements oscillatoires, et il est particulièrement intéressant d'observer qu'en présence de chloramphénicol, de To + 2h à To + 8h, ce phénomène est rompu au profit d'une relation hyperbolique, tandis qu'à To + 16h le point représentatif rejoint la courbe circulaire "normale".

I-7 - Projets de recherches.

Compte-tenu de la localisation mitochondriale chez l'Abeille d'une importante activité tréhalasique (1), il serait nécessaire de poursuivre cces recherches sous plusieurs angles :

a) Action comparée d'inhibiteurs mitochondriaux et d'inhibiteurs cytoplasmiques, en mettant l'accent sur la plus grande spécificité possible. Objectif : savoir si certaines fractions des complexes en présence sont d'origines biosynthétiques différentes à l'intérieur de la cellule.

b) Isolement et purification des fractions moléculaires : détermination de leur P.M., de leurs propriétés cinétiques particulières et de leur spécificité.

c) Reconstitution expérimentale de complexes fonctionnels à partir des formes purifiées, et analyse de leursspropriétés.

d) Comparaison des structures successives des formes moléculaires ayant changé de spécificité au cours d'une induction particulière (exemple : augmentation d'activité saccharasique d'un complexe naturel induit par le tréhalose ...).

e) Voir chap. II-3.

Le développement de ces projets dépendra des bourses de thèses que pourra obtenir le laboratoire.

II - THEORIE "STOECHIOMETRIQUE" DES ENZYMES COOPERATIVES. (M. BOUNIAS, 1983 : C.R. Acad. Sc., **t. 297**, Ser III, p. 583-588).

Ce travail constitue la troisième contribution du laboratoire de biochimie à la connaissance théorique des mécanismes moléculaires enzymatiques. Il résulte des réflexions suscitées depuis longtemps par les propriétés cinétiques des α-glucosidases

(1) BRANDT et al., 1979, Can. J. Biochem., 57, 1210-1215.

II-1 - BIOCHIMIE GENERALE - Une interprétation stoechiométrique de la signification du coefficient de Hill de certaines ensymes de cinétiques coopératives. Aplications aux α-glucosidases d'Abeilles. Note (*) de Michel BOUNIAS, présentée par Jean ROCHE.

INTRODUCTION. — La première description algébrique d'un cas de coopérativité remonte, en fait, aux travaux de A. V. Hill, en 1910 [1] à propos des recherches de Bohr [2] sur la fixation de l'oxygène par l'hémoglobine. Elle précède donc de quelques années le modèle de Michaelis et Menten [3], dont V. Henri avait toutefois ébauché l'analyse dès 1903 [4]. Il a pourtant fallu attendre encore près de 50 ans pour que Umbarger [5] mette l'accent sur la déviation d'une cinétique enzymatique par rapport à la loi de Henri et Michaelis-Menten, puis que Monod, Changeux et Jacob [6] décrivent le phénomène en faisant appel à l'équation de Hill. Depuis, bien que de nombreuses publications continuent d'attribuer des interprétations « michaéliennes » à des courbes manifestement coopératives, des incohérences ont été de plus en plus souvent mises en évidence dans les résultats d'application des méthodes classiques [7], jusqu'à ce que C. M. Hill et coll., 1977 [8] en viennent à se demander, à l'inverse, s'il existe une seule enzyme « michaelienne »! Aux cinétiques « allostériques » selon le modèle de Monod, Wyman et Changeux, 1965 [9] se sont ensuite ajoutées diverses formes de cinétiques à coopérativité négative [10] qui en constituent les manifestations « symétriques » relativement au cas « michaelien ». Le modèle allostérique [9] rend compte des mécanismes à coopérativité positive, tandis que sa variante proposée par Koshland, Némethy et Filmer, 1966 [11] peut également s'appliquer à la coopérativité négative. Même si d'autres mécanismes, tels que les cinétiques à plusieurs composantes superposées (Fonlupt, Martinet et Pacheco, 1979) [12], voire des artefacts, peuvent se traduire par des cinétiques atypiques, un bon nombre de réactions impliquant un seul substrat et plusieurs formes de la même enzyme sont assimilables à des cas particuliers de coopérativité dont l'équation de Hill donne une représentation mathématique satisfaisante, à défaut d'en fournir une interprétation physiologique concrète.

Au cours de recherches sur la régulation de la glycémie de l'Abeille, nous avons observé que le coefficient de Hill (n_H) des *p* NPα-glucosidases de l'hémolymphe varie *in vitro* [13], [14] et *in vivo* [15] en raison inverse de la concentration en glucose, que sa valeur initiale soit inférieure à 1 (larves, nymphes) ou supérieure à 1 (butineuses). L'hypothèse selon laquelle cette activité enzymatique pouvait revêtir alternativement les deux formes coopératives opposées, en fonction de nécessités physiologiques, s'est trouvée étayée par les résultats de l'action d'effecteurs pharmacologiques sous forme de la transition d'une

coopérativité négative à une coopérativité positive [16]. De telles transitions ont d'ailleurs été également signalées chez d'autres enzymes [17], ce qui nous a déterminé à développer l'étude d'une interprétation, ébauchée en 1978 [18], visant à attribuer à l'équation de Hill une signification moléculaire concrète applicable à des cas où n_H n'est pas égal à un nombre entier et ne peut donc être assimilable, par exemple, à un nombre de sites du ligand.

PRINCIPE THÉORIQUE. — Dans les cas où « l'enzyme » est ordonnée par ensembles fonctionnels comportant n_E sous-unités actives (oligomères) qui interagissent avec n_s molécules de substrat, la réaction s'écrit :

$$(1) \qquad n_E E + n_s S \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} [ES] \overset{K_2}{\rightleftharpoons} n_E E + n_s P,$$

avec E, S, P, = concentrations en enzyme, substrat et produits; [ES] = complexe enzyme-substrat; K_1, K_{-1}, K_2 = constantes de vitesses.

En réduisant le système (1) à son expression relative à une seule sous-unité active, il apparaît :

$$(2) \qquad E + n_s/n_E . S \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} \ldots$$

ce qui met en évidence l'analogie du coefficient de Hill (n_H) en tant que nombre de molécules de substrat qui interagissent, au bilan, par molécule d'enzyme, avec le quotient des ordres partiels de réaction, soit : $n_H = n_s/n_E$. Dans des conditions satisfaisant l'hypothèse de Briggs et Haldane, la vitesse initiale sera déterminée par les réactifs initiaux soit :

$$(3) \qquad v_0 = K . [E]^{n_E} . [S]^{n_s},$$

expression dans laquelle la valeur de K ne s'identifiera formellement ni à K_1 ni à K_2, tandis que n_E et n_s revêtent la signification chimique classique découlant de la loi d'action de masse.

MATÉRIEL ET MÉDHODES. — L'activité des α-glucosidases de l'hémolymphe d'Abeilles (*Apis mellifera*) a été déterminée *in vitro* selon les techniques précédemment décrites [13]. Les paramètres cinétiques enzymatiques ont été calculés sur la base de l'équation de Hill, au moyen des méthodes algébriques rigoureuses de Endrenyi et coll. [21] et de Bounias [20], ainsi que par la forme logarithmique de l'équation de Hill, appliquées à l'ensemble de la « courbe de saturation » $v_0 = f(S)$.

Les ordres partiels n_E et n_s ont été déterminés d'après les variations respectives de la vitesse en fonction des concentrations en enzyme à concentration en substrat fixe, et des concentrations en substrat à concentration

EXPLICATION DES PLANCHES

Planche I

Fig. 1. — Variations de la vitesse de réaction ($\mu M . mn^{-1}$) des α-glucosidases de l'hémolymphe de pré-nymphes d'Abeilles en fonction de la quantité d'extrait enzymatique (µl/200 µl) pour quatre concentrations différentes de substrat (*p*-nitrophényl α-D-glucoside) : (0) = 0,25 mM; (△) = 0,5 mM; (□) = 1,25 mM; (◇) = 2,5 mM. Les écarts sont indiqués pour 2 mesures.

Fig. 1. — Velocity ($\mu M . min^{-1}$) of haemolymph α-glucosidases of pre-nymph honeybees versus haemolymph concentrations (µl per 200 µl) at 4 substrate concentrations: (0) = 0,25 mM; (△) = 0.5 mM; (□) = 1.25 mM; (◇) = 2.5 mM. Means ± SD are given from duplicate determinations.

Fig. 2. — Variations de la vitesse de réaction ($\mu M . mm^{-1}$) des α-glucosidases de l'hémolymphe d'Abeilles adultes en fonction des concentrations en substrat S (*p*.nitrophényl α-D-glucoside, mM) (2-A) et en fonction des concentrations en extrait enzymatique E (µl pour 200 µl) (2-B : forme bilogarithmique). (Coefficients de variation < 0,08 pour 2 à 3 mesures).

Fig. 2. — Velocity ($\mu M . min^{-1}$) of haemolymph α-glucosidases of adult honeybees versus substrate concentrations (mM, p-nitrophenyl α-D-glucoside) (2-A) with 1 µl and 5 µl haemolymph. (2-B) = bilogarithmic form. Coefficient of variation < 0,08 for duplicate and triplicate determinations.

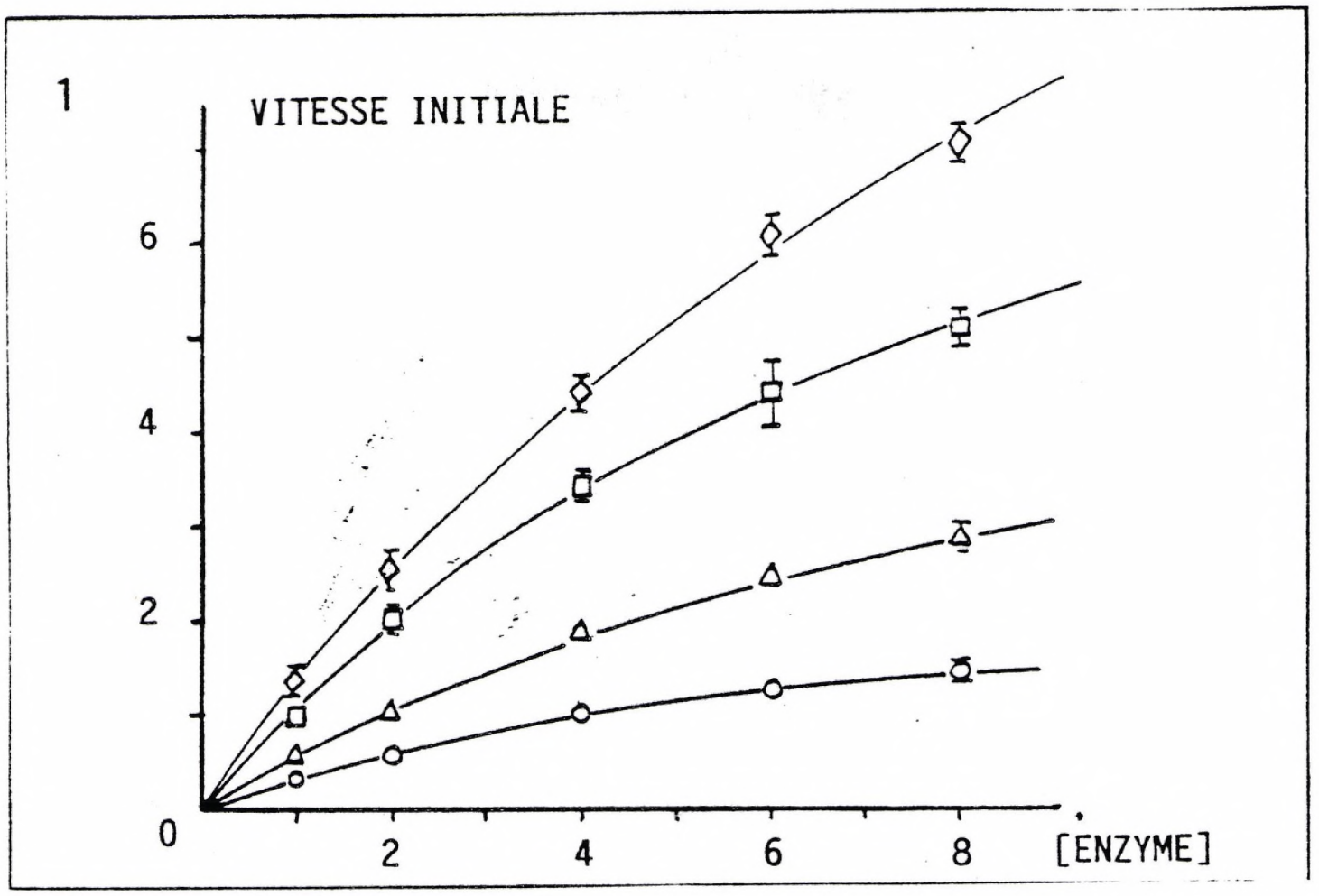

1
VITESSE INITIALE
6
4
2
0
2
4
6
8
[ENZYME]

Fig. 12

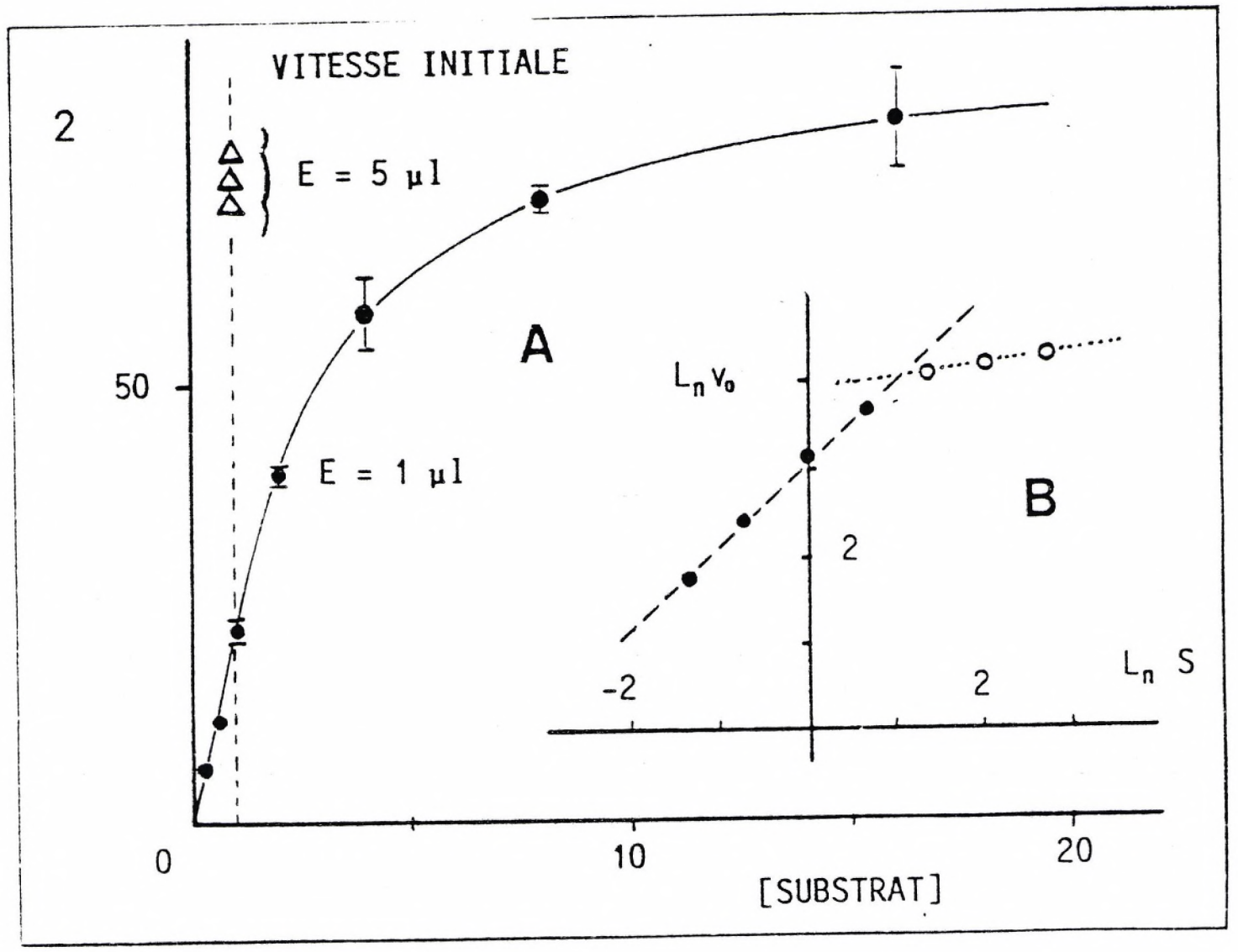

2
VITESSE INITIALE
E = 5 µl
E = 1 µl
A
50
0
10
20
[SUBSTRAT]
$L_n V_o$
B
2
-2
2
L_n S

Fig. 13

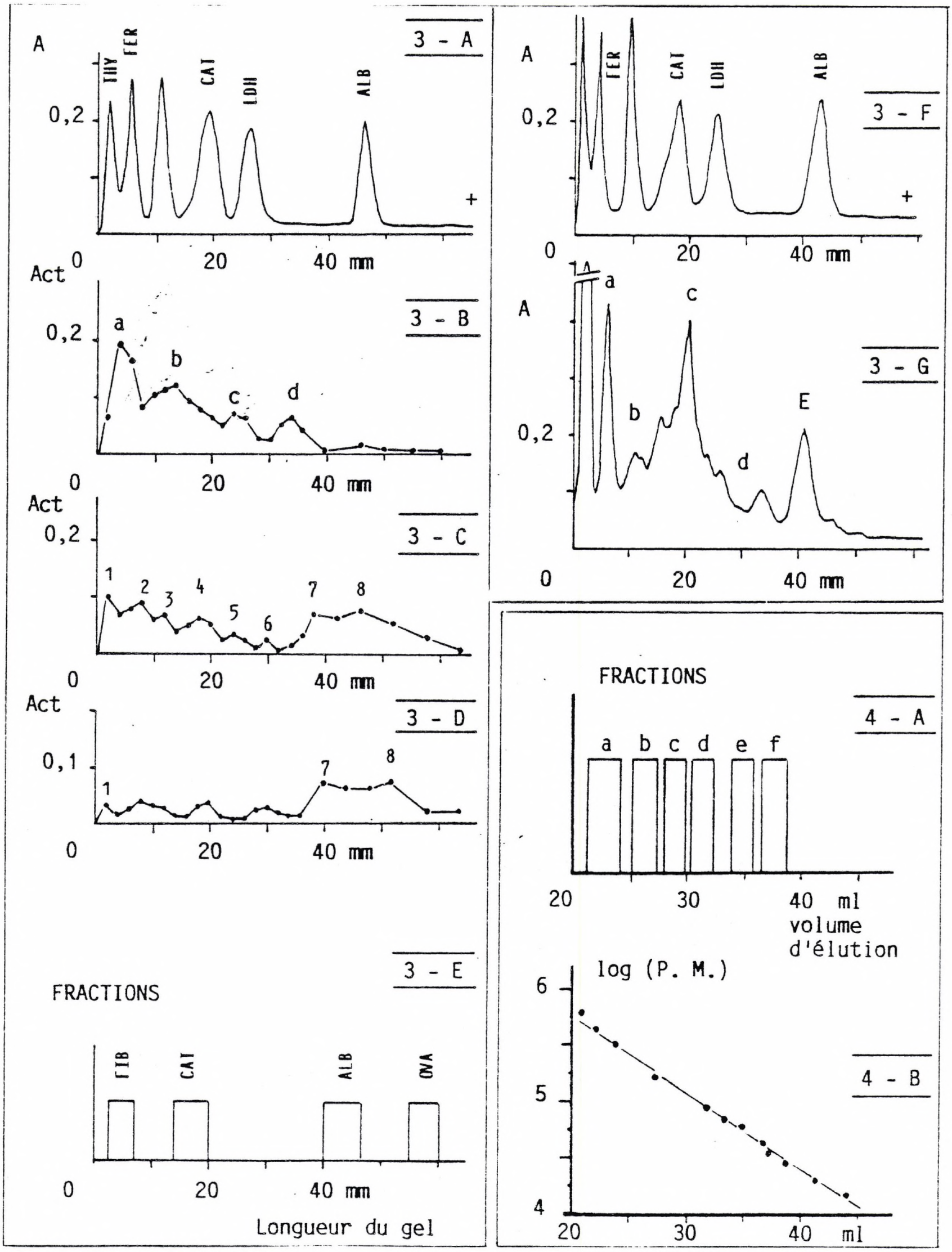

3 - A
A
0,2
THY
FER
CAT
LDH
ALB
+
0
20
40 mm
3 - B
Act
0,2
a
b
c
d
3 - C
1
2
3
4
5
6
7
8
3 - D
0,1
3 - E
FRACTIONS
FIB
CAT
ALB
OVA
Longueur du gel
3 - F
3 - G
E
4 - A
a b c d e f
20
30
40 ml
volume
d'élution
4 - B
log (P. M.)
6
5
4

Fig. 14 et 15.

Planche II

Fig. 3. — Séparation électrophorétique des protéines et des *p*NPα-D-glucosidases d'Abeilles selon les conditions précédemment décrites [13], [23] : A et F, mélange de protéines étalons (Pharmacia, « HMW »); B, α-glucosidases : spectre initial; C et D, α-glucosidases traitées par le dithiothréitol 1% et 5% resp.; E, mobilité de protéines étalons séparées isolément; G, spectre protéique de l'hémolymphe (révélé au bleu de coomassie). Les concentrations et les vitesses sont exprimées en unités arbitraires (A, absorbance; Act, activité enzymatique). Symboles utilisés : THY, Thyroglobuline (PM 660 000); FER, Ferritine (PM 440 000); FIB, Fibrinogène (PM, 340 000); CAT, Catalase (PM, 230 000); LDH, Deshydrogénase lactique (PM, 140 000); ALB, Albumine (PM, 67 000); OVA, Ovalbumine (PM, 43 000).

Fig. 3. — Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins and pNPα-D-glucosidases of Honeybees: A and F, standard proteins (Pharmacia HMW); B, α-glucosidases: initial pattern; -C and D: α-glucosidases after 1% and 5% dithiothreitol treatment; E, mobility of standard proteins from separate runnings; G, Haemolymph proteins (visualized by coomassie BB). Velocities and concentrations are expressed in arbitrary units (A, absorbance; Act, activity). Symbols are: THY, Thyroglobulin (MW = 660 000); FER, Ferritin (MW, 440 000); FIB, Fibrinogen (MW, 340 000); CAT, Catalase (MW, 230 000; LDH, lactic deshydrogenase (MW, 140 000); ALB, albumin (MW, 67 000); OVA, Ovalbumin (MW, 43 000).

Fig. 4. — Filtration sur gel Séphadex G-200 (col. 50 × 1 cm) : A, position des principales fractions protéiques dans l'hémolymphe; B, courbe d'étalonnage des poids moléculaires (PM) (mélange des protéines étalons Pharmacia : HMW + LMW).

Fig. 4. — Gel filtration on Sephadex G-200 (50 × 1 cm column): A = position of the major haemolymph protein fractions; B = Molecular weights (MW) calibration (using standards "HMW + LMW" from pharmacia).

en enzyme fixe. La courbe de régression $L_n v_0 = f(L_n E)$ a pour pente n_E et la courbe $L_n v_0 = f(L_n S)$, prise dans sa partie linéaire initiale a pour pente n_s. Les ordonnées à l'origine de chacune de ces courbes (F_E et F_s) déterminées pour plusieurs valeurs de S ou de E respectivement, permettent dans chaque cas de déterminer également l'ordre partiel complémentaire d'après les relations : $L_n(F_E) = n_s L_n S + L_n K$ et $L_n(F_S) = n_E L_n E + L_n K$.

RÉSULTATS. — A. *α-glucosidases de pré-nymphes d'Abeilles : coopérativité négative.* — A partir d'un même extrait d'hémolymphe, les courbes $v_0 = f(E)$ ont été répétées à quatre concentrations différentes du substrat S (*fig.* 1 A). Les droites $L_n v_0 = f(L_n E)$ ont donné $n_E = 0{,}766 \pm 0{,}064$ (N = 4 mesures) et $n_s = 0{,}508$ (5 couples; $\rho = 0{,}985$) tandis que les droites $L_n v_0 = f(L_n S)$ ont donné $n_s = 0{,}65 \pm 0{,}03$ (N = 5 mesures) et $n_E = 0{,}770$ (5 couples; $\rho = 0{,}770$). Le quotient des moyennes générales $\bar{n}_E = 0{,}767 \pm 0{,}045$ et $\bar{n}_s = 0{,}615 \pm 0{,}052$ a pour valeur : $\bar{n}_s/\bar{n}_E = 0{,}801 \pm 0{,}12$. Les mesures du coefficient de Hill ont donné une valeur moyenne : $\bar{n}_H = 0{,}793 \pm 0{,}13$ (N = 4 mesures). Les deux estimations $\bar{n}_s/\bar{n}_E$ et $\bar{n}_H$ ne sont séparées que par un écart relatif de 1,0%.

B. *α-glucosidases d'Abeilles adultes : coopérativité positive.* — Les cinétiques effectuées à partir de l'hémolymphe de butineuses ont donné les résultats illustrés par la figure 2. En utilisant les mesures effectuées avec 1 et 5 µl d'extrait enzymatique, (S = 1 mM), le calcul donne $n_E = 0{,}734$, tandis que les vitesses mesurées pour S = 0,125/0,25/0,5/1 mM (E = 1 µl) permettent de déterminer : $n_s = 0{,}933$ soit un quotient $n_s/n_E = 1{,}27$.

L'application à l'ensemble de la courbe de saturation des méthodes algébriques de détermination des paramètres enzymatiques [20] aboutit par ailleurs à $\bar{n}_H = 1{,}297 \pm 0{,}209$ (N = 5 mesures), soit un écart relatif de 2,1%.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. — Dans chacun des cas analysés, la haute concordance observée entre les valeurs du coefficient de Hill (n_H) et celles du quotient des ordres partiels (n_s/n_E) confère pour le moins, aux hypothèses de départ et aux propriétés qui peuvent en découler, la validité épistémologique d'un « terme de disposition ». Le principal élément de discussion provient du fait que n_s ni n_E, pas plus que n_H, ne sont des nombres entiers : ceci suggère que l'équation (1) s'applique ici à une unité fictive, comme l'est, par exemple, une molécule dont la formule brute est donnée par l'analyse élémentaire, hors de toute connaissance de la masse molaire. Le coefficient n_E apparaît donc seulement comme le quotient du nombre N_E de protomères constituant chaque complexe fonctionnel par un entier α. Le produit αn_s représente alors le nombre réel de molécules

de substrat traitées par chaque unité de N_E molécules d'enzyme. Le coefficient de Hill apparent sera $n_H = \alpha n_s / N_E$ et si chaque protomère possède β sites du substrat, les valeurs de n_H pourront varier, en théorie de 0 à β, par fractions successives de $1/\beta N_E$. Il est intéressant de noter que cette conception ne postule pas nécessairement l'existence d'une seule forme du complexe enzymatique, un coefficient global pouvant s'exprimer par : $n_H = \alpha \Sigma_1^x n_{s_x} / \Sigma_1^x N_{E_x}$: ceci rendrait alors conciliables les doctrines souvent contradictoires concernant l'intérêt respectif des mesures sur des préparations enzymatiques brutes ou purifiées, c'est-à-dire, plus proches soit de l'état *in vivo*, soit d'une sous-unité strictement isolée de son contexte physiologique.

Dans le but d'évaluer le nombre possible (N_E) de sous-unités actives, nous avons traité les complexes enzymatiques α-glucosidasiques de l'hémolymphe d'Abeilles par le dithiothréitol et obtenu certaines fractions de masse molaire apparente 8 fois plus petites environ (*fig.* 3 et 4), ce qui est à rapprocher des résultats obtenus par Nakano et coll. [20] pour les tréhalases de Rat. Avec $N_E = 8$, nos résultats expérimentaux permettent de situer les valeurs de α et de $N_s = \alpha n_s$, soit chez les nymphes : $\alpha = 10$ et $N_s = 6$ et chez les adultes : $\alpha = 11$ et $N_s = 10$, chiffres compatibles avec $\beta = 2$. Les variations de N_s, qui expriment celles de l'affinité globale du ligand, dépendent du mode et du degré d'association des protomères, selon des mécanismes compatibles avec chacune des théories classiques [9] [11] ou de leurs variantes [24], en fonction des structures enzymatiques concernées. D'autres vérifications du « modèle stoechiométrique » ont été également obtenues pour des phosphatases d'insectes et de végétaux (Bounias, non publié) de sorte qu'il est permis d'espérer que, sans sous-estimer les risques inhérents à une conception d'un réalisme aussi simpliste, eu égard à la « philosophie de l'expérience » [25], la concordance des résultats expérimentaux avec les prédictions découlant du modèle proposé soient de nature à faire progresser tant soit peu la compréhension des mécanismes moléculaires de certaines enzymes coopératives.

(*) Remise le 28 novembre 1983.

[1] A. V. HILL, *J. Physiol.*, 40, 1910, 4 p.
[2] C. BOHR, *Zentr. Physiol.*, 17, 1903, p. 682.
[3] L. MICHAELIS et M. L. MENTEN, *Biochem. Z.*, 49, 1913, p. 333.
[4] V. HENRI, *Lois générales de l'action des diastases*, Hermann, Paris, 1903.
[5] H. E. UMBARGER, *Science*, 123, 1956, p. 848.
[6] J. MONOD, J. P. CHANGEUX et F. JACOB, *J. Mol. Biol.*, 6, 1963, p. 306.
[7] B. C. CUNHA et M. VITOLO, *Rev. Farm. Bioquim. Univ. Sao Paulo*, 14, 1976, p. 23-24.
[8] C. M. HILL, R. D. WAIGHT et W. G. BARDSLEY, *Mol. Cell. Biochem.*, 15, 1977, p. 173-178.
[9] J. MONOD, J. WYMAN et J.-P. CHANGEUX, *J. Mol. Biol.*, 12, 1965, p. 88-118.
[10] M. LAZDUNSKI, C. PETITCLERC, D. CHAPPELET et C. LAZDUNSKI, *Eur. J. Biochem.*, 47, 1971, p. 124-139.
[11] D. E. KOSHLAND, G. NEMETHY et D. FILMER, *Biochem.*, 5, 1966, p. 365.
[12] P. FONLUPT, M. MARTINET et H. PACHECO, *J. Fr. Biophys. et Méd. Nucl.*, 3, 1979, p. 133-136.
[13] M. BOUNIAS, *Comptes rendus*, 285, série D, 1977, p. 1263-1266.
[14] M. BOUNIAS, *Experientia*, 36, 1980, p. 157-158.
[15] M. BOUNIAS, *Comp. Biochem. Physiol.*, 66 B, 1980, p. 335-341.
[16] M. BOUNIAS, *Biochem. Pharmacol.*, 31, 1982, p. 2769-2775.
[17] P. FRIEDRICH, *J. Theor. Biol.*, 81, 1979, p. 527-532.
[18] M. BOUNIAS, *C.R. Ann. Trav. Lab. Biochimie*, 7, 1978, p. 30-33.
[19] G. E. BRIGGS et J. B. S. HALDANE, *Biochem J.*, 19, 1925, p. 338.
[20] M. NAKANO, Y. SUMI et M. MIYAKAWA, *J. Biochem.*, 81, 1977, p. 1041-1049.
[21] L. ENDRENYI, C. FAJSZI et F. KWONG, *Eur. J. Biochem.*, 51, 1975, p. 317-328.
[22] M. BOUNIAS, *Comp. Biochem. Physiol.*, 63B, 1979, p. 407-417.
[23] M. BOUNIAS, *Apidologie*, 6, 1975, p. 207-232.
[24] H. F. FISHER, R. E. GATES et D. G. CROSS, *Nature*, 228, 1970, p. 247-249.
[25] B. D'ESPAGNAT, *A la recherche du réel*, Gauthier-Villars, 1980, 175 p.

Laboratoire de Biochimie, C.R. d'Avignon,
Domaine Saint-Paul, B.P. n° 91, 84140 Montfavet.

II-2 - Application aux phosphatases animales et végétales.

a) Phosphatases intestinales de l'Abeille.

Les résultats numériques indiqués dans le tableau 1 ont été traités selon la théorie stoechiométrique.

Tableau 1 - Variations de la vitesse de réaction des phosphatases intestinales d'Abeilles naissantes en fonction de la concentration en extrait enzymatique (exprimé en µl et en fonction de la concentration en substrat (mM., paranitrophényl-phosphate). Les vitesses sont exprimées en µM de substrat hydrolysé par minute par la quantité d'enzyme contenue dans 1 intestin. Les variance s_x sont données pour (n) mesures.

Extrait enzymatique *	vitesse (N) s_x	Substrat	vitesse (N) s_x
		0,625	0,93(3)0,11
5,0	3,10(3)0,16	1,25	1,41(4)0,11
7,5	3,97(3)0,29	2,50	1,99(6)0,15
10,0	4,87(4)0,30	5,0	2,71(4)0,26
15,0	6,40(2)0,10	10,0	3,35(2)0,58
20,0	7,32(3)0,13	20,0	4,02(3)0,23
-	-	40,0	4,45(4)0,41

* 5 l correspondent à 0,1 intestin ;
S = 10 mM [E] = 5 l

Les calculs conduisent à $n_E = 0,672$ et $n_S = 0,513$ soit $n_S/n_E = 0,763$. Par les équations enzymologiques appliquées à l'équation de Hill sur l'ensemble de la courbe de saturation, nous obtenons : $n_H = 0,766 \pm 0,065$ (N=6 mesures) les deux valeurs concordent à 0,4% près !

b) Phosphatases végétales.

Les phosphatases alcalino-neutres de Medicago minima, dont le site actif est en cours d'étude (voir 2ème partie) ont donné les relations illustrées par la fig. 16. Le calcul selon la théorie stoe-

chiométrique donne : n_E = 0,74 et n_S = 0,50, soit n_S/n_E = 0,675. L'analyse enzymologique "classique" donne, quant à elle, un coefficient de Hill n_H = 0,635 ± 0,13 (N=6 mesures) soit un écart relatif de 6,3%.

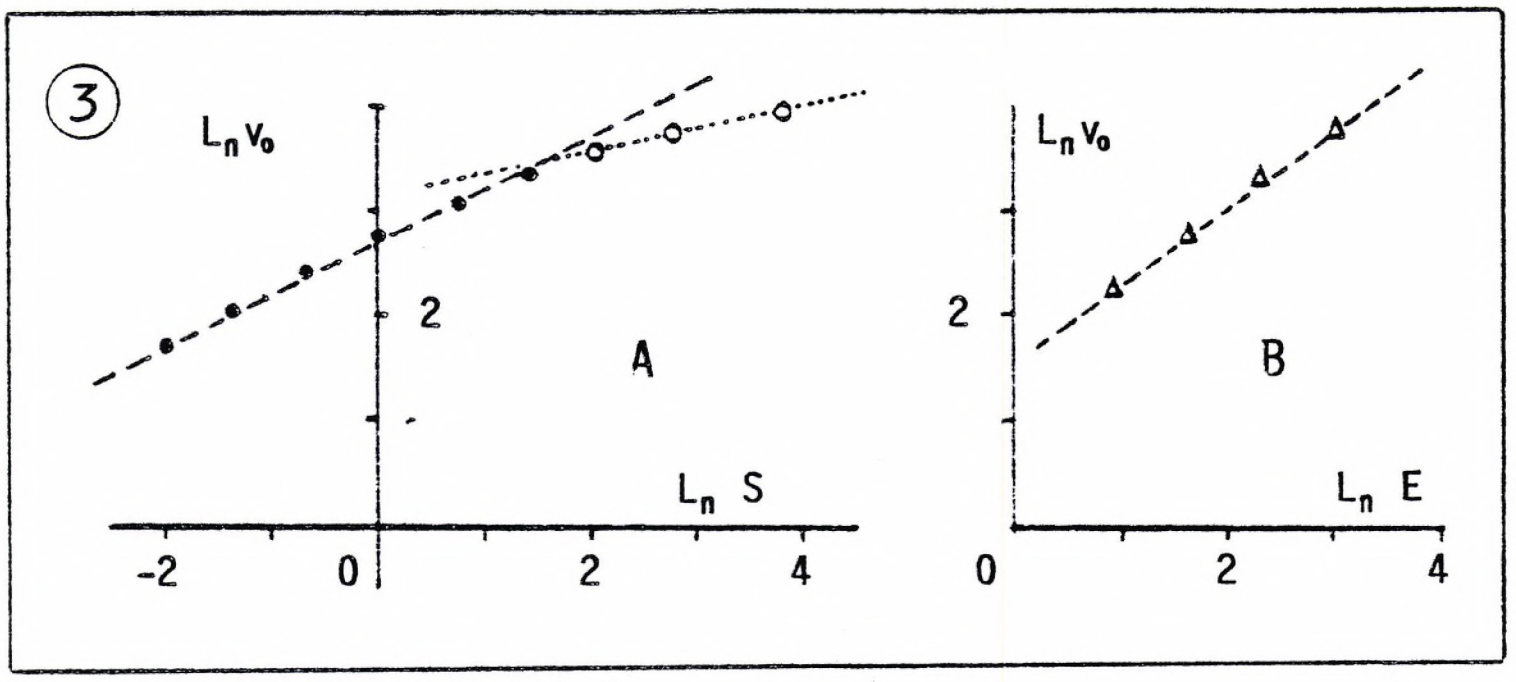


Fig. 16 - Formes bilogarithmiques des variations de la vitesse de réaction ($\mu M.mn^{-1}$) des phosphatases foliaires de Medicago minima en fonction des concentrations en substrat (p.nitrophénylphosphate, mM) (3-A) et des concentrations en extrait enzymatique E (1 µl correspond à 0,2 mg de poids frais)(3-B). (Coefficients de variation < 0,06).

La validité de la théorie est donc confirmée dans le cas d'autres hydrolases **animales et végétales.**

II-3 - Projets de recherches.

Ces travaux devraient être poursuivis d'une part sous l'angle fondamental, et d'autre part en regard de leurs applications possibles.

- **Aspects fondamentaux** : isolement, purification et propriétés (P.M. et cinétiques) des formes moléculaires en présence. Reconstitution expérimentale de complexes fonctionnels et analyse de leurs propriétés. Recherche des facteurs susceptibles d'agir sur les modes d'association possibles (voir § suivant) au cours des processus inductifs. Etude approfondie du problème de la spécificité, qui suscite actuellement des recherches chimiques importantes à propos du site actif des tréhalases de vertébrés (1).

(1) DEFAYE et al., 1980, Nouv. J. Chimie, **4**, 59-68.

- **Applications** à l'adaptativité fonctionnelle des enzymes aux conditions créées par l'introduction de substances de types xénobiotiques : conséquences pour la mise en oeuvre de processus de **détoxification** par induction indirecte ou croisée.

Deuxième Partie

BIOCHIMIE GENERALE ET METHODOLOGIQUE

Dans les chapitres qui suivent, des techniques biochimiques particulières ont été mises en oeuvre dans les phases préparatoires à de nouvelles recherches. C'est le cas de l'approfondissement de la valeur sémiologique des phosphatases pour l'interprétation des traumatismes biochimiques chez les insectes et les végétaux). D'autres part, certaines méthodes dont les performances étaient jugées insuffisantes, face à des cas difficiles, ont été retravaillées de manière à mieux faire apparaître le rôle des divers paramètres techniques sur le résultat final : c'est le cas de l'analyse des glucides des végétaux et des moustiques, ainsi que de celle des pigments photosynthétiques, pour lesquels, les recherches effectuées sous contrat avec le C.N.E.S. ont fait apparaître l'existence, sous certaines conditions, de formes moléculaires "fragilisées", anormalement sensibles aux artefacts. Les progrès effectués dans ce domaine sont déjà appliqués dans le cadre des recherches en collaboration avec la Faculté des Sciences d'Avignon (mécanismes moléculaires liés à la résistance des végétaux aux pathogènes).

I-1 - **Techniques cinétiques de compétition des substrats en enzymologie végétale.** (M. BOUNIAS et M.R.J. MORGAN).

La méthode de compétition des substrats, déjà évoquée dans le chapitre I-3 de la première partie, a été employée lors d'une étude préparatoire des propriétés régulatrices des phosphatases alcalino-neutres des feuilles de Medicago minima.

Les extraits sont préparés par broyage de 100 mg de feuilles fraîches dans 500 µl de tampon tris pH 7,2 contenant du phloroglucinol 60 mM comme inhibiteur de mélanisation.

Les propriétés initiales de l'enzyme sont les suivantes (avec une concentration "standard" de 1 mg d'extrait/200 µl de milieu réactionnel)

V_M = 45,2 µM/mn (s = 10,5 pour N = 30)
K = 2,78 mM (s = 0,53 pour N = 30)
n = 0,66 (s = 0,12 pour N = 30)

Cependant, chaque série expérimentale est interprétée en fonction des "témoins" particuliers correspondants.

◊ La courbe de pH optimal (fig. 17) correspond aux deux catégories principales : la fonction lysosomale (pH < 6) et la fraction neutre (pH ~ 7 à 7,5) impliquée dans le métabolisme courant. C'est à cette dernière qu'est consacré le présent travail.

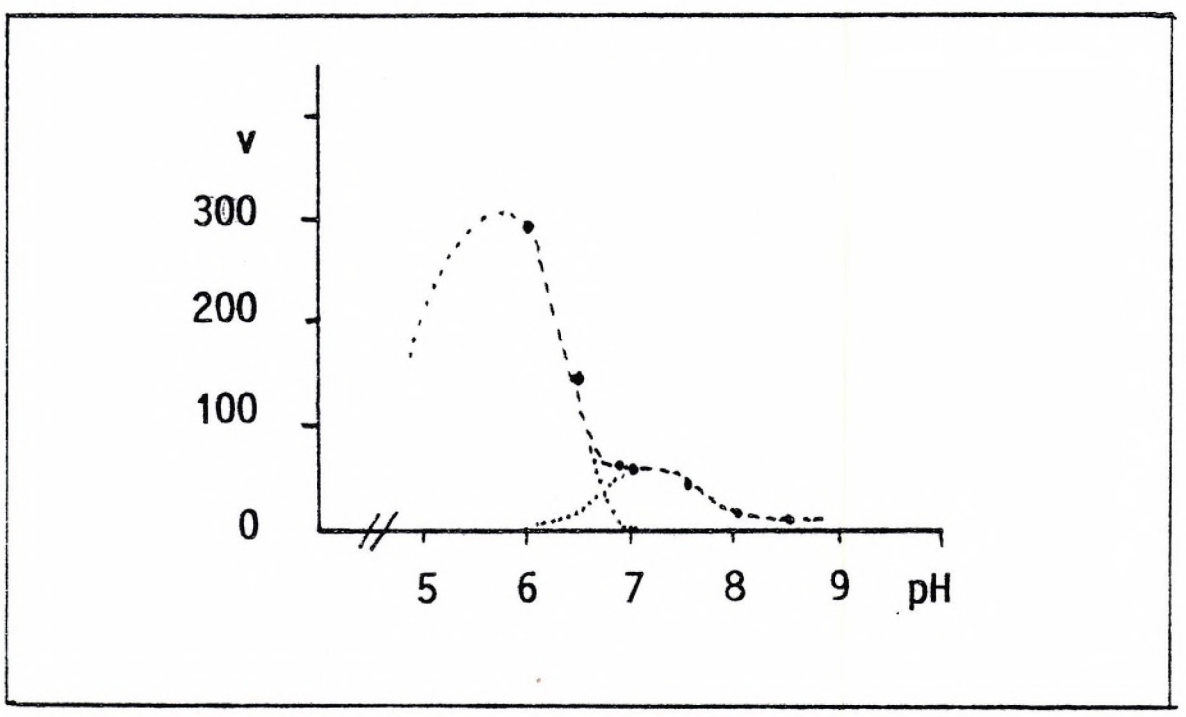


Fig. 17 - Variations de la vitesse de réaction des phosphatases foliaires de Medicago en fonction du pH. Enzyme: 4 mg de feuilles/µl. Substrat : 10 mM. v s'exprime en µM/mn.

◊ L'action de la température se manifeste entre 30 et 36°C selon une courbe illustrée par la fig. 18.

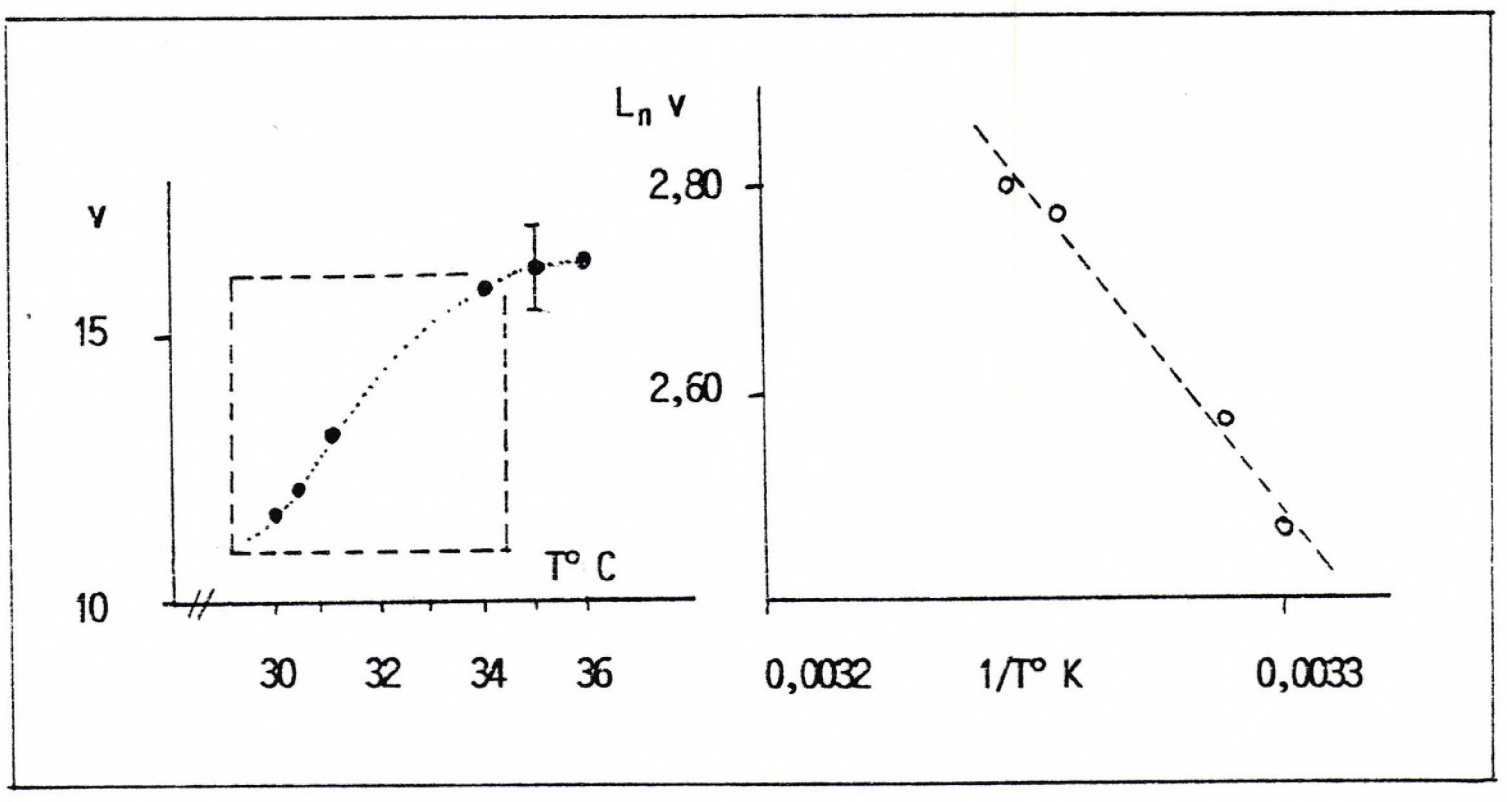


Fig. 18 - Variations de la vitesse des phosphatases pH 7,2 (S=1 mM) avec la température : A : courbe directe B : droite d'Arrhénius.

La loi d'Arréhnius : $K = A.e^{-\frac{E}{RT}}$ exprimée en coordonnées logarithmiques permet de calculer la constante d'activation thermique entre 30 et 34°C, soit juste avant le fléchissement de la courbe par thermo-inactivation. Le calcul de régression donne : $\rho = -0,990$, $L_n\ A = 23,378$ (soit A=1,42) et $-E/R = -6.331,28$ soit, avec $R = 8,32$ J. $d°^{-1}.mole^{-1}$: $E = 52,67$ KJ.$d°^{-1}mole^{-1}$.

◊ L'action de divers effecteurs naturels a été analysée à partir des 3 systèmes suivants :

$V_o = f(S)$
$v_i = f(I) + (S)$ cste
$v_i = f(S) + (I)$ cste

avec pour substrat de référence le pNP-Phosphate.
Les vitesses sont déterminées avec des coefficients de variation compris entre 0,03 et 0,06.

Les résultats ci-dessous correspondent à un dépouillement <u>partiel</u> des documents expérimentaux. Les moyennes ne sont donc pas définitives et c'est pour cette raison que les paramètres statistiques ne figurent pas encore dans l'exposé.

a) Ion Phosphate.

Les courbes v=f(S) donnent les paramètres suivants (extrait réf. 83.03-2) :

Témoins : $V_M = 53,25$ M/min. K=3,05 mM n = 0,749 (N=4)
PO_4^{--} 10 mM : $V_M = 66,7$ µM/min. K=18,5 mM n = 0,78

Ces chiffres traduisent une inhibition compétitive (type K "pur") avec $f_i = 6,06$ soit $K_i = 1,97$ mM. L'inhibiteur a plus d'affinité pour l'enzyme que le substrat artificiel.

Le même calcul effectué sur un autre extrait (83-01) a donné $f_i = 8,65$ soit $K_i = 1,30$ mM, ce qui confirme la conclusion précédente. L'équation de CHOU, établie pour S=4 mM de I=0 à I=32 mM donne : $n_i \simeq 0,8$. Par contre, pour S=1 mM, de I=0 à I=0,2 mM, nous obtenons $n_i=2,0$. Il n'y a pas de transition du coefficient de Hill aux fortes concentrations en substrat, mais l'inhibiteur pourrait agir selon un mécanisme allostérique pour $S << K$ ...

b) Histidine.

Le seul amino-acide ayant montré une action significative, à rapprocher de son radical imidazole, catalyseur d'hydrolyse ...

Sur les échantillons réf. 83.02 nous avons obtenu :

Témoins : V_M = 38,05 µM/mn K = 3,82 mM n = 0,50 (N=6)

His 10 mM : V_M = 33,15 µM/mn K = 4,52 mM n = 0,477 (N=2)

d'où l'identification d'un mécanisme compétitif mixte avec f_i = 1,18 soit K_i = 55,5 mM et f'_i = 1,15 soit K'_i = 68 mM. Les courbes de DIXON avec [His] = 10 et 20 mM donnent des valeurs de K_i allant de 37 à 54mM ce qui confirme le pouvoir inhibiteur (relativement faible) de l'histidine vis-à-vis de l'enzyme et du complexe enzyme/substrat, dans des proportions équivalentes.

c) Acide Ascorbique.

L'acide ascorbique est un effecteur d'oxydo-réduction dont les rôles exacts dans la cellule végétale (et animale) ne sont pas véritablement connus. Son activité sous forme neutralisée en milieu tampon a été étudiée dans les échantillons (83.05.1).

Témoins : V_M = 60,92 µM/mn ; K = 2,58 mM ; n = 0,713 ; V_M/K = 22,16

ASC (30 mM) : V_M = 64,3 µM/mn ; K = 2,72 mM ; n = 0,726 ; V_M/K = 23,64

Nous n'obtenons pas d'effet significatif -(K_i > 500 mM !).

Toutefois, la courbe v=f(I) pour des valeurs comprises entre I=1 et I=40 mM permet de mettre en évidence un léger effet inhibiteur avec $n_i \simeq 1$ et $I_{50} \simeq 55$ mM. Il subsiste donc un doute, mais l'ascorbate ne semble pas pouvoir être classé parmi les effecteurs des phosphatases.

d) β-glycéro-Phosphate.

Dans les échantillons réf. 83.03.2 nous obtenons :

Témoins : V_M = 61,0 µM/mn ; K = 2,81 mM ; n = 0,703 ; (N=2)

β-glycéro-P (40mM) : V_M = 64,1 µM/mn ; K = 7,42 mM ; n = 0,854 ; (N=3)

L'inhibition est compétitive, avec f_{K^i} = 2,64 soit : $K_i \simeq 24,4$ mM Sur n la valeur f_{n^i} = 1,21 est à la limite de signification. L'équation de CHOU, avec I = 10 à 80 mM donne $n_i \simeq 0,95$ soit une transition michaélienne pour l'inhibiteur, qui confirme la signification du facteur f_{n^i}.

Avec le glycérol libre (40 mM) nous obtenons :

V_M = 64,7 µM/mn ; K = 3,18 mM ; n = 0,639.

Le facteur $f_{K^i} \simeq 303$ mM montre qu'il n'y a pas d'action inhibitrice du radical non phosphorylé.

D'autres mesures effectuées à partir des échantillons 83.04, avec 10 mM et 50 mM de β-glycéro-phosphate, selon la méthode de DIXON ont donné $K_i \simeq 10$ mM et $k_i \simeq 50$ mM. La courbe de CHOU conduit à $n_i \simeq 0,75$.

Le β-glycéro-phosphate est donc un substrat à tendance michaélienne pouvant comporter 2 sites.

e) Glucose-1-Phosphate.

Dans les échantillons réf. 83.05.2, les calculs donnent :

Témoins : V_M = 61,12 µM/mn ; K = 2,43 mM ; n = 0,755 (N=5)

Glc-1-P 40 mM : V_M = 47,3 µM/mn ; K = 4,42 mM ; n = 0,873 (N=3)

d'où au niveau de l'enzyme : f_{K^i} = 2,35 : K_i = 29,6 mM

et du complexe enzyme-substrat : f'_i = 1,29 : K ≃ 137 mM

L'équation de CHOU, déterminée entre I = 0,01 et I = 80 mM donne $n_i \simeq 0,95$ et $I_{50} \simeq 55$ mM ≠ K_i.

Le radical glucose libre donne V_M = 57,8 µM/mn, K ~ 2 mM et n ~ 0,763 : il n'a donc pas d'effet.

Le glucose 1-P est un substrat à tendance michaélienne comportant 1 site d'affinité équivalente de celle du β-glycéro-P.

d) Glucose-6-Phosphate.

La courbe de saturation établie avec 40 mM donne :

V_M = 54,4 µM/mn ; K = 5,94 mM ; n = 0,850 (N=3)

Ceci correspond à f'_i = 1,06 à 1,12 soit K'_i > 333 mM V_M /K = 9,16 soit $K_i \simeq 20,4 \pm 2,5$ mM.

La courbe v = f(Glc-6-P) révèle une phase d'activation pour les concentrations 0,05 et 0,1 mM -v_i = v_o pour I = 0,5 mM puis nous entrons dans la phase d'inhibition - Celle-ci, analysée entre I = 1 et I = 80 mM donne $n_i \simeq 0,78$, et $K_i \simeq 28,4$ mM.

Le glucose-6-P est un substrat à tendance coopérative négative, agissant sur 1 seul site avec une affinité plutôt supérieure à celle des précédents esters.

f) Fructose-6-Phosphate.

Les mesures effectuées sur les échantillons 83.03.2 ont donné les résultats suivants :

Témoins : V_M = 73,26 µM/mn ; K = 3,69 mM ; n = 0,671

Fru-6-P (40 mM) : V_M = 75,24 µM/mn ; K = 9,31 mM ; n = 0,784

L'inhibition est du type compétitif pur : f_i = 2,52 soit K_i = 26,2 mM

Le coefficient de Hill "résultant" tend à augmenter (+17%) en présence de Fru-6-P : nous avons donc calculé sa valeur spécifique d'après le système de CHOU, pour I = 10 mM à I = 80 mM, avec S = 1 mM. Le calcul donne n_i = 1,165 et I_{50} = 35,8 mM.

Le fructose-6-P agit sur un seul site, avec une affinité comparable à celle du glucose-1-P, mais la transition est à coopérativité apparente positive.

Le radical fructose libre donne, à la concentration de 40 mM V_M = 70 µM/mn ; K = 3,34 mM ; n = 0,755. Il est donc possible que la structure furannose joue un rôle dans l'évolution de la coopérativité (à vérifier avec d'autres oses de structures voisines).

g) Fructose 1-6 di-Phosphate.

A la concentration de 40 mM dans le milieu réactionnel, cet important métabolite, dont le rôle régulateur commence à être admis de plus en plus largement, conduit aux résultats suivants (Réf. 83.03.2.f)

Témoins : V_M=73,25 µM/mn ; K=3,69 mM ; n=0,671 ; V_M/K=19,85

Fru-1-6-di P (40 mM): V_M=65,6 µM/mn ; K=8,91 mM ; n=0,816 ; V_M/K= 7,36

L'inhibiteur est d'apparence mixte, avec pour paramètres :

sur l'enzyme seule : f_i = 2,70 soit K_i = 23,5 mM

sur le complexe (ES) : f'_i= 1,116 soit K'_i= 344,8 mM

La valeur élevée de K'_i montre qu'il s'agit plus probablement d'un effet indirect que d'une fixation sur un site particulier du complexe.

Les données calculées dans le système de CHOU, avec I = 10 mM à I = 80 mM conduisant à : $n_i \simeq 0,78$ et I_{50} = 29,5 mM.

La présence d'un second radical phosphate, augmente légèrement la valeur de n mais neutralise l'inversion de coopérativité précédemment observée. Le pouvoir inhibiteur est accru de 21 %.

I-2 - Projets de recherches.

Ce programme constitue une préparation à l'étude des propriétés du site actif des phosphatases, dont nous nous proposons d'analyser les relations possibles entre spécificité et formes moléculaires.

◊ L'objectif suivant pourrait constituer un sujet de 3e cycle.
- Fractionnement par catégories de poids moléculaires et purification sur supports complémentaires (hydroxy-apatite p. ex.).
- Détermination du pH optimal de chaque fraction à partir d'un substrat artificiel (p. ou o. N.P.-P).
- Paramètres cinétiques de chaque fraction, au pH optimal, avec le substrat artificiel.
- Pour chaque fraction, comparaison des paramètres cinétiques de divers substrats naturels par la méthode de compétition précédemment décrite.
- Extension à l'étude d'inhibiteurs ou activateurs naturels par double compétition cinétique.
- Conclusions quant aux fonctions métaboliques spécifiques de chacune des fractions du spectre des phosphatases cellulaires.

◊ Les application ultérieures sont nombreuses :
- Extension à la localisation cellulaire de chaque fraction (collaboration avec le Prof. COULOMB, Fac. Sc. Avignon).
- Détermination des traumatismes biochimiques écotoxicologiques par l'identification du secteur fonctionnel impliqué d'après le type de phosphatase dont l'activité serait modifiée.

II-1 - Chromatographie nano-quantitative des pigments photosynthétiques. (M. BOUNIAS - Non publié).

Certaines conditions, par exemple l'état de photosynthèse ralentie, en période hivernale, paraissent se traduire, sur un biotope donné, par un état moléculaire anormalement fragile des pigments chlorophylliens (1). Au cours des chromatographies, il arrive, alors, quelquesfois, que les chlorophylles A et B se transforment en dérivés allomérisés (A', B') puis oxydés (A", B"), et que le noyau Mg se détache plus facilement de la structure porphyrinique, avec production de phéophytines et de phéophorbides.

Les techniques précédemment décrites (2) ont donc été révisées dans le but de pallier ces inconvénients. Des améliorations très substantielles ont été obtenues avec les procédés suivants :

(1) BOUNIAS, Note technique CNES n°16, p. 41-64.
(2) BOUNIAS, Ouvrage Ed. Masson, 1983 : p. 102.

a) Plaques imprégnées d'anti-oxydants.

Le dithionite ($Na_2S_2O_4$: 10 mM) et le thiosulfate ($Na_2S_2O_3$: 10 à 20 mM) utilisés comme agents d'imprégnation suppriment totalement l'allomérisation oxydative des chlorophylles. Toutefois, la dégradation de la chlorophylle A en phéophytine reste importante. Nous avons également observé des phénomènes d'oxydo-réduction de xanthophylles secondaires liés à la présence de l'anti-oxydant ainsi qu'une dégradation rapide du β-carotène après la fin des migrations.

Les éluants doivent être adaptés à la nature de l'anti-oxydant utilisé :

Le système quaternaire : benzène-heptane-(acétone ou méthyl-éthyl-cétone)-méthanol (50-30-10-10 v/v) est satisfaisant dans les deux cas.

Le système binaire heptane-acétate d'éthyle présente l'avantage d'une grande stabilité -ses propriétés ont été étudiées systématiquement en fonction des proportions d'acétate d'éthyle- . L'optimum se situe vers 50% avec le dithionite et 60% avec le thiosulfate (fig. 19).

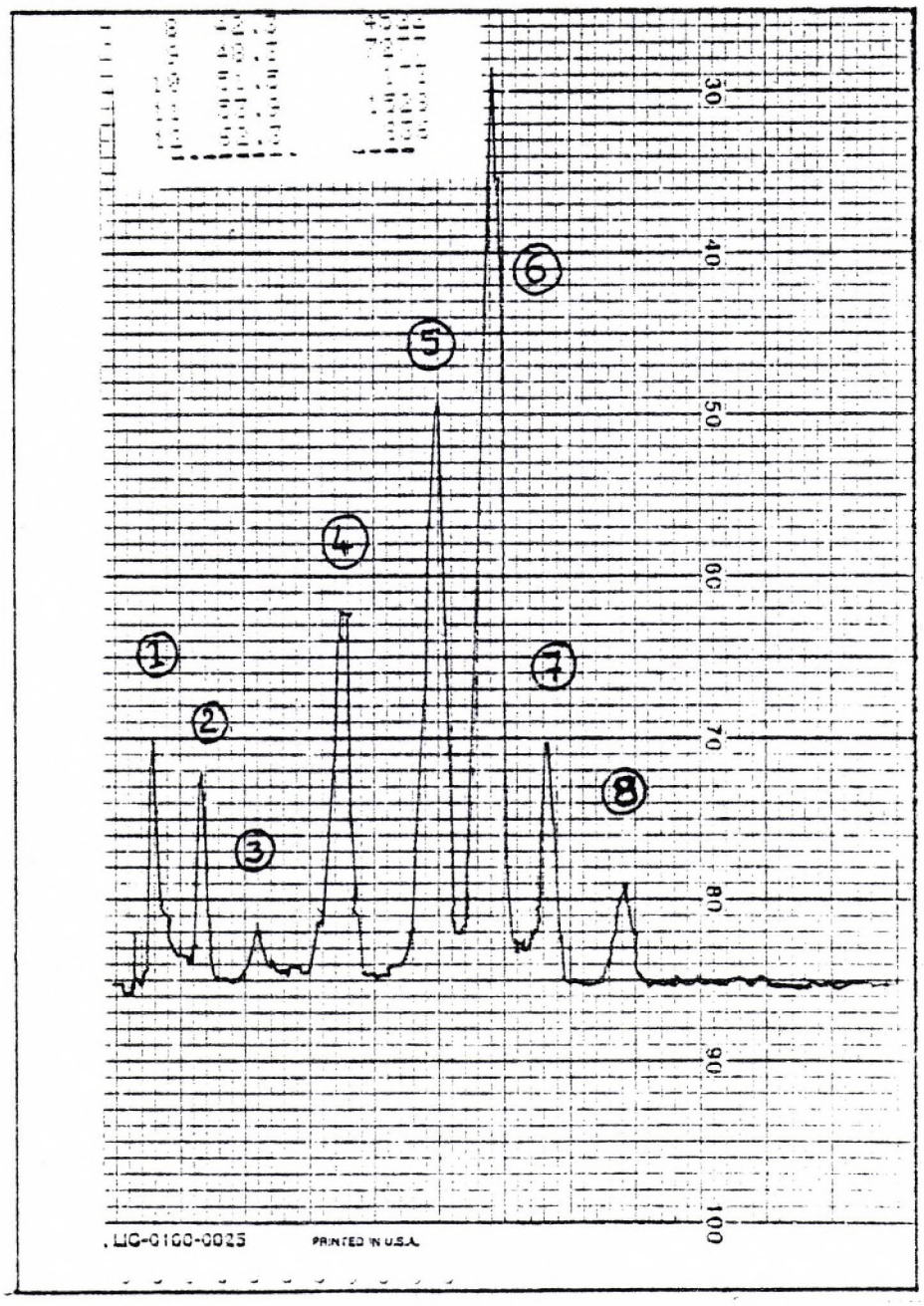


Fig. 19 - Chromatogramme de pigments photosynthétiques sur plaque de silice imprégnée de $MgCl_2$ Eluant : heptane-acétate d'éthyle (40-60 v/v) 1=chlorophyllides. 2 et 3=xanthophylles mineures. 4=lutéine. 5=chlorophylles B. 6=chlorophylle A. 7=phéophytine A. 8=β carotène.

b) Imprégnation par $MgCl_2$.

La présence de Magnésium pouvait être a priori considérée comme favorable à la stabilité du noyau chlorophyllien, par effet d'"action de masse". En réalité, avec 50 mM de $MgCl_2$, l'allomérisation oxydative des chlorophylles est neutralisée et les xanthophylles sont correctement séparées, mais la chlorophylle A reste fortement dégradée. Cette dégradation, exprimée par l'évolution du rapport Chl.A/Ph.A en fonction du temps de rétention sur la plaque avant élution, est illustrée par la fig. 20.

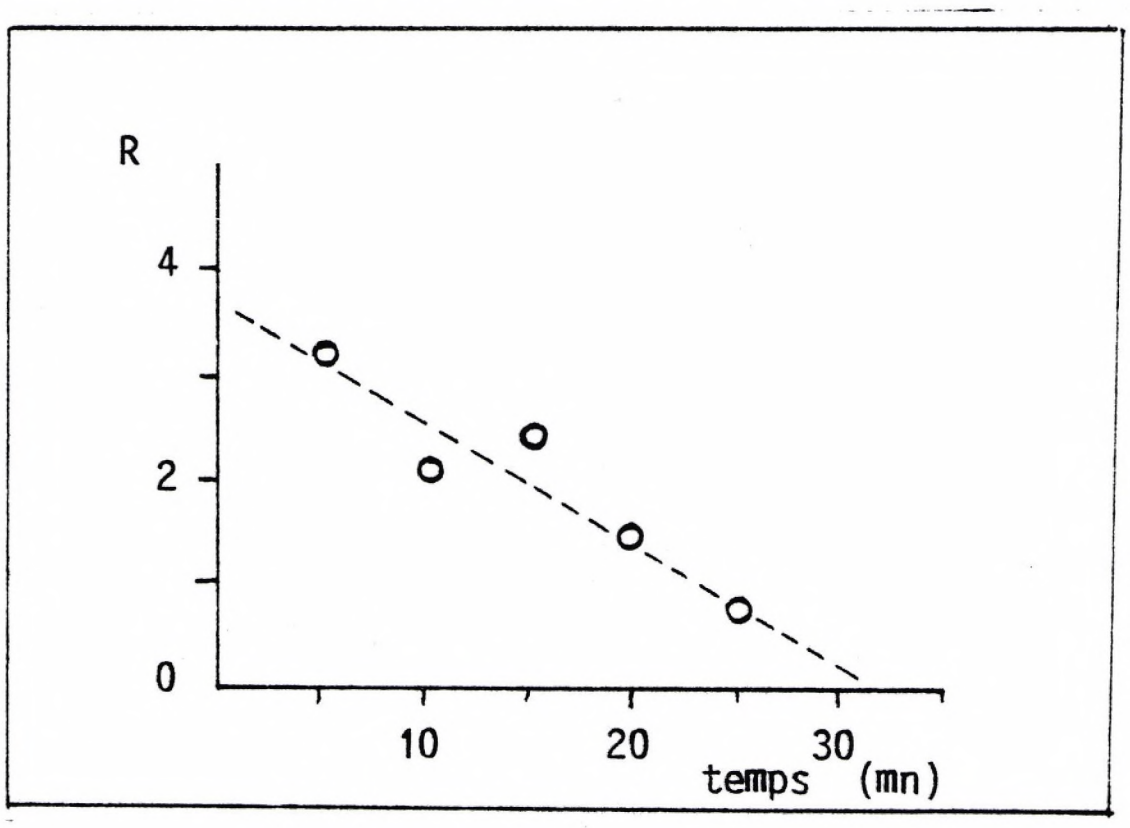


Fig. 20 - Variations du rapport R = Chl.A/Ph. en fonction du temps d'attente des extraits sur les plaques de silice avant élution.

La perte de magnésium, exprimée par la diminution du rapport molaire R = Chl.A/Ph.A, est fonction linéaire du temps de rétention t_R (mn) : pour N=5 couples de mesures, la corrélation est hautement significative : $\rho = -0,935$ (P= 0,02) et l'équation de régression s'écrit : $R = -0,11\ t_R + 3,68$.

c) Ajustement du pH.

La phéophytine est produite en milieu acide (1)(2) : il est donc vraisemblable que c'est l'acidité de la silice qui joue le rôle le plus important : l'imprégnation des plaques par du tampon Tris pH 7,5

(1) VERNON, 1960, Anal. Chem., 32, 1144
(2) WILSON et al., 1963, Anal. Chem., 35, 144

(0,4 M) additionné de $MgCl_2$ (15 mM final) a donné les résultats indiqués dans le tableau 2.

Tableau 2.

Concentrations exprimées en nmoles/mg		
Temps de Rétention	Chloroph. A	Phéophytine A	R=Chl.A/Ph.A
5 mn	0,49	0,085	5,76
10 mn	0,49	0,069	7,10
15 mn	0,47	0,074	6,35

Le rapport molaire de la chlorophylle (A) phéophytine s'établit donc à un niveau très élevé, non correlé significativement avec le temps.

d) Technique des imprégnations comparées.

Une même plaque peut recevoir 3 traitements différents après séparation des secteurs par élimination d'une ligne de support, dans le sens vertical, entre chaque secteur. La Fig. 21 en illustre un exemple qui a été filmé, en cours d'expérimentation, par la chaîne de télévision TF1.

Ce travail analytique se poursuit en 1984 et devrait déboucher sur de nouvelles données concernant l'étalonnage en valeurs absolues des chlorophylles (A) et (B) et du carotène, par enregistrements avec le nouveau spectrophotomètre CS-930.

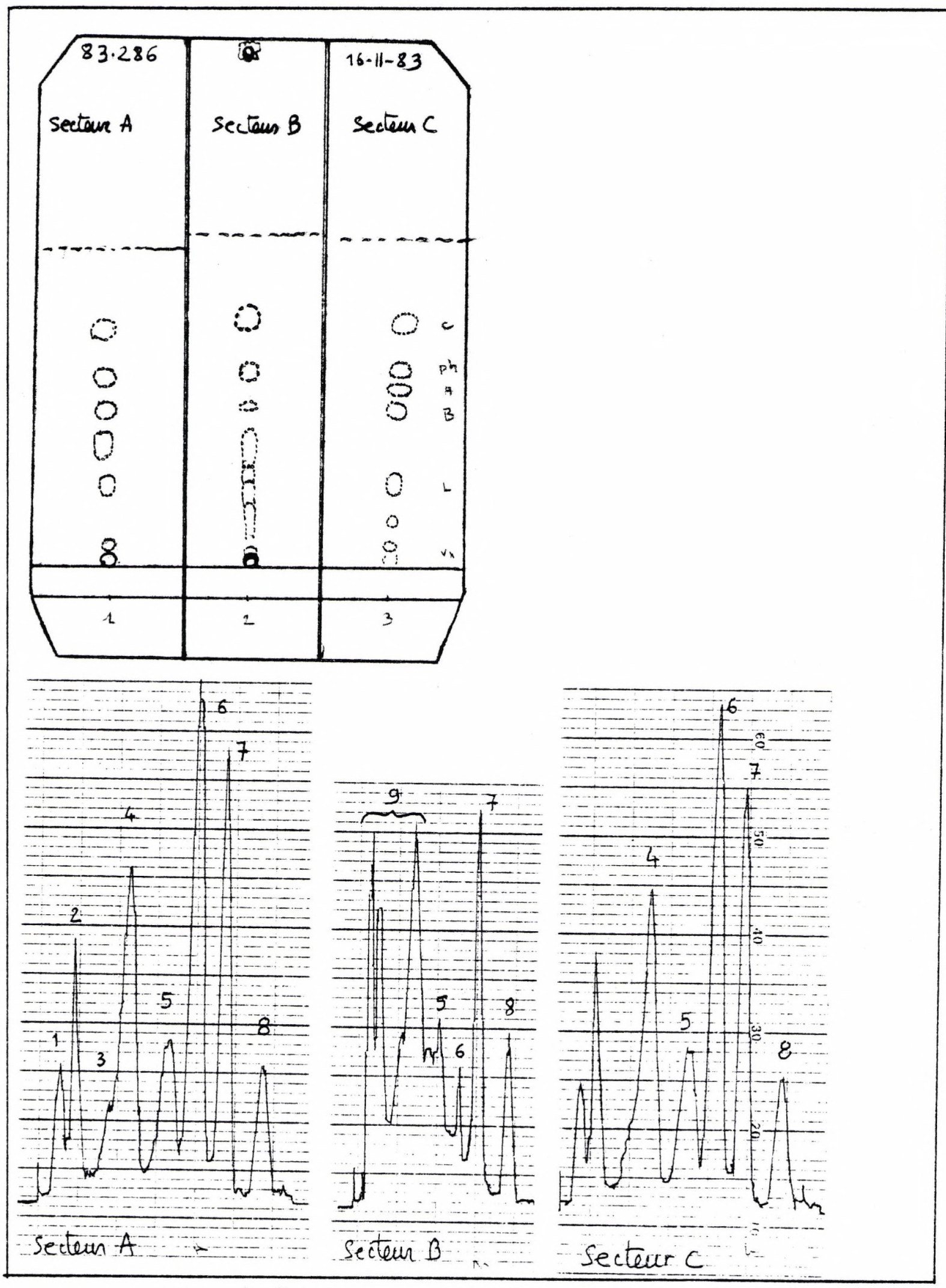


Fig. 21 - Influence du traitement de la plaque sur la chromatographie des pigments photosynthétiques. Secteur A : thiosulfate. Secteur B : pas de traitement. Secteur C : $MgCl_2$ - Numéros : 1 à 8 = comme fig.19. 9 = dérivés oxydés et allomérisés.

II-2 - Projets de recherches.

Nous envisageons de compléter ces travaux par l'emploi de la HPLC pour la purification et l'identification des diverses formes de xanthophylles, dont le rôle physiologique exact n'est pas encore parfaitement élucidé, et dont l'étude des implications dans les mécanismes de résistance comme dans les traumatismes métaboliques des végétaux pourrait être d'un grand intérêt (1). La biosynthèse des caroténoïdes des fruits du piment capsicum annuum a fait récemment l'objet de très intéressants travaux (2)(3)(4)(5) par l'équipe du Professeur MONEGER. La question de la finalité de la biosynthèse, dans le fruit, de caroténoïdes absents des chloroplastes reste posée et pourrait être éventuellement en relation avec les capacités de résistance, en raison des différences considérables existant entre les fruits respectifs des variétés sensibles et résistantes aux pathogènes.

Par ailleurs, un composant dont le spectre évolue rapidement, par autoxydation d'un type caroténoïdien à un type "protochlorophyllide" a pu être mis en relation avec certains traumatismes biochimiques dont il constitue un indice sensible (6). Son étude devrait donc être approfondie, en relation avec les problèmes de résistance des végétaux aux infections et aux toxiques agro-chimiques.

Enfin, les pigments photosynthétiques peuvent avoir un rôle à jouer dans la régulation de la glucogenèse non photosynthétique dont l'étude est en projet (voir 4e partie, chap. III-4).

III - RECHERCHE D'UNE METHODE OPTIMALE D'EXTRACTION DES PIGMENTS PHOTOSYNTHETIQUES ET DES PHOSPHATASES DANS UN MEME ECHANTILLON DE FEUILLES.

Les recherches ont été effectuées sur capsicum, dans le cadre du programme "relations hôtes/parasites et induction de résistance" en relation avec la faculté des sciences d'Avignon.

(1) TUKENDORF et al., 1980. Acta Soc. Bot. Pol., **49**, 435-443
(2) BILAL et al., 1980. C.R. Acad. Sc. D-**291**, 303-306
(3) BILAL et al., 1982. C.R. Acad. Sc., III. **294**, 549-551
(4) DOGBO et al., 1982. C.R. Acad. Sc., III. **294**, 649-652
(5) BILAL et al., 1983. Plant Physiol., **73**, 94-99
(6) BOUNIAS, 1983. Note techn. CNES, n°16, p. 53-56

Les composants lipidiques sont extraits au chloroforme

Les composants enzymatiques sont extraits à l'eau déionisée

Trois techniques différentes ont été éprouvées :

1) double extraction simultanée par le mélange chloroforme/eau (1-1 v/v)
2) extraction chloroformique, centrifugation puis extraction aqueuse à partir du culot
3) extraction aqueuse, centrifugation, puis reprise du culot par le chloroforme.

L'analyse comparée des pigments photosynthétiques et des activités phosphatasiques a donné les résultats résumés dans les tableaux 3 et 4.

Tableau 3 - Influence du mode d'extraction des composants hydrophiles sur le rendement d'extraction des pigments photosynthétiques (voir texte).-(Expression en nmoles/mg frais).

Mode d'extraction :	(1)	(2)	(3)
Chlorophylle A	1,89 ± 0,68	2,42 ± 0,43	1,75 ± 0,65
Chlorophylle B	0,84 ± 0,11	0,95 ± 0,15	0,76 ± 0,03
Phéophytines	1,01 ± 0,01	0,97 ± 0,01	1,18 ± 0,12
β carotène	0,09 ± 0,01	0,14 ± 0,03	0,14 ± 0,12
Lutéine	0,53 ± 0,04	0,75 ± 0,13	0,66 ± 0,41
Chl.A/Ph.	1,87	2,49	1,48

Tableau 4 - Influence du mode d'extraction des lipides sur les paramètres cinétiques des phosphatases foliaires (voir texte).

Mode d'extraction :	(1)	(2)	(3)
Paramètres (N=4)	$\bar{x}$ (sx)	$\bar{x}$ (sx)	$\bar{x}$ (sx)
V_M ($\mu M.mn^{-1}$)	18,38 (0,52)	28,50 (3,35)	36,80 (3,95)
K m M	1,83 (0,07)	3,03 (0,47)	2,35 (0,36)
n (par voie classique)	1,41 (0,04)	0,78 (0,06)	0,91 (0,06)
n_E par V=f(E)	0,739	0,931	0,625
n_S par V=f(S)	0,903	0,570	0,611
$\frac{n_S}{n_E}$ (théorie stoech.)	1,22	0,610	0,978

Le protocole n°2 est le meilleur pour l'extraction des pigments et le protocole n°3 conserve le maximum d'activité, comme on pouvait s'y attendre. le protocole n°1 étant éliminé, il convenait de choisir entre les deux autres : les chlorophylles sont très fortement affectées par le traitement n°3, tandis que le traitement n°2 conserve l'activité enzymatique à raison de 77,5% pour (V_M) et (K), et n'accentue la coopérativité que dans le même sens que pour les témoins ($n < 1$).

L'examen des paramètres enzymatiques permet de constater une nouvelle fois la vérification de la théorie stoechiométrique dans des cas extrêmes ($n > 1$ et $n < 1$), et suggère de nouvelles hypothèses.

◊ Incidences enzymologiques.

Il est tout à fait remarquable de constater que le chloroforme n'affecte que relativement modérément l'activité et le type de coopérativité de l'enzyme, tandis que l'émulsion eau/chloroforme transforme complètement les paramètres :

V_M diminue de 50%

K diminue de 22%

n augmente de 55%, (augmentation de l'affinité apparente du ligand)
(inversion de coopérativité !)

La diminution de V_M ne traduit pas forcément une inactivation partielle de l'enzyme, puisque la constante de dissociation diminue : le complexe (E-S) est plus stable et reste fonctionnel.

Compte tenu du lien que nous avons suggéré entre le mode d'association des protomères enzymatiques, et l'expression de la coopérativité, les résultats suggèrent que les conditions **détergentes** créées par lémulsion (eau/chloroforme) ont apporté des modifications à la composition de la fraction aqueuse, se traduisant par une réorganisation du complexe phosphatasique.

Le chloroforme seul n'est pas à même d'apporter une modification de même sens (au contraire). Ce serait donc plutôt par introduction dans la phase aqueuse d'un composant de polarité complexe, que se produirait le changement de propriétés de l'enzyme. Cette hypothèse est étayée par l'observation dans la phase aqueuse de l'extrait d'une coloration vert-franc provenant de noyaux porphyriniques devenus hydrosolubles.

Ces observations devraient faire l'objet de nouvelles recherches, en raison de l'intérêt qu'elles peuvent présenter dans le domaine fondamental de la connaissance des effecteurs naturels du contrôle des paramètres enzymatiques.

IV-1 - DEVELOPPEMENTS DES TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE DES GLUCIDES.

(Avec la participation de M. COLAVIZZA, IUT de Montpellier).

Les techniques précédemment décrites (1)(2)(3) ont été développées en vue de leur extension dans deux directions précises :

a) Glucides végétaux : spectre complet, y compris polyholosides lourds et oses-phosphorylés.

b) Glucides de l'hémolymphe d'Aedes : contribution à l'étude d'un composant manifestement mal identifié par d'autres chercheurs.

Les résultats ont amené des progrès déjà substantiels, succintement résumés ici. Les recherches analytiques se poursuivent, en fait, de manière permanente.

a) Glucides végétaux.

L'influence des alcools c_1 à c_3, de l'acétonitrile, de la méthyl-éthyl-cétone a été analysée dans les solvants destinés aux oses de taille inférieure à celle du stachyose (4 unités hexose). Les résultats ont permis d'augmenter très sensiblement la mobilité des hexoses et des di ou triholosides, sans en altérer la résolution.

La chromatographie des amyloses, des amylopectines et du glycogène, déjà abordée en 1982, a présenté de sérieuses difficultés, peut être imputables au vieillissement des substances étalons.

L'étude des hexoses phosphorylés a été parallèlement abordée, en raison de l'importance métabolique de ces composés et de leurs relations avec l'activité des phosphatases dont ils constituent autant de substrats potentiels.

(1) BOUNIAS, 1969. Chimie Analytique, 51, 76-82
(2) BOUNIAS, 1976. Analusis, 4, 87-93
(3) BOUNIAS, Ouvrage -Masson Ed.- Op. Cit., p. 41-57.

La recherche d'une technique unique permettant de doser à partir d'un même chromatogramme les composants de l'amidon, les oses-phosphates et les oses "légers" tient peut-être un peu de l'utopie, mais des résultats encourageants ont été obtenus (fig. 22).

Le tableau 5 résume la description des systèmes éluants les plus intéressants. Les propriétés chromatographiques des principaux glucides libres sont indiquées dans le tableau 6, et celles des oses-phosphorylés le sont dans le tableau 7.

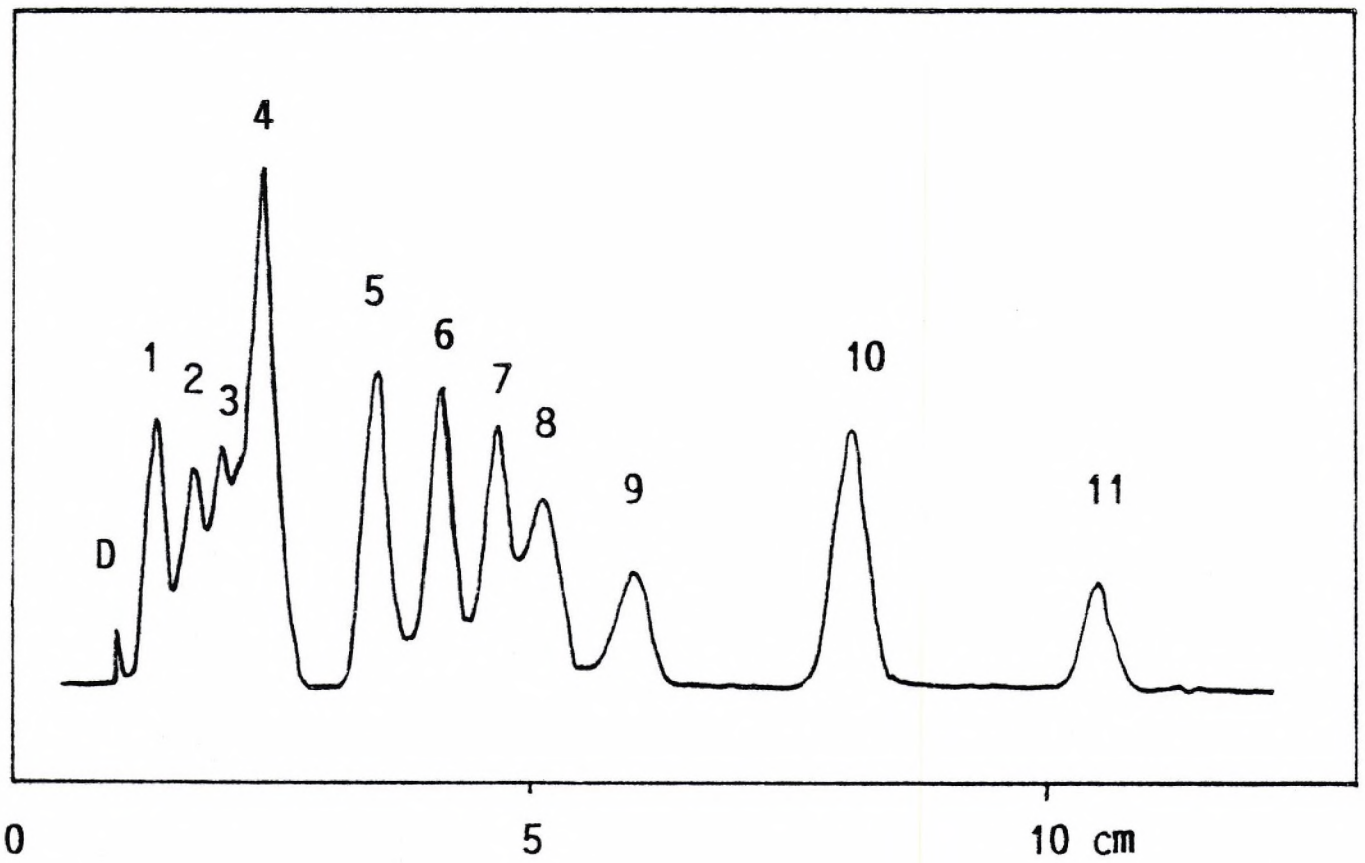


FIG. 22 - Chromatogramme d'un mélange de glucides étalons sur couche de silice. Eluants : 1) B-Et-A-E (40-30-10-20) : 2x12cm ; 2) B-A-E (60-20-20) : 1x13cm. (1)=amylose (1µg) ; (2)=Fructose 1-6-di-P. (3)=Fru-6-P + Glc-6-P ; (4)=Raf.(1nmole) ; (5)=Mal. (1 nmole) ; (6)=Sacc. (1 nmole) ; (7)=Glc (2 nmoles) ; (8)=Fru (1 nmole) ; (9)=Xyl (2 nmoles) ; (10)=Rha (2 nmoles); (11)=Dig. (2 nmoles). D=point de départ. (Enreg. CS920 - λ = 540 nm).

Tableau 5 - Systèmes éluants utilisés pour la chromatographie des glucides.

Composition des éluants (v/v) (ordre alphabétique du 1er composant)	Hauteurs (cm) des migrations successives	Nos de Référence 1983
AN - Am - E (60-20-20)	11,3 + 12,1	4
AN - IAm - E (60-20-20)	10,6 + 13,1	5
B - Et - A - E (40-25-15-20)	9 + 11,6	6
B - Et - A - E (40-30-10-20)	7,5 + 11,5	6 a
B - Et - A - E (40-30-10-20) AN - Am - E (60-20-20)	7,3 11,9	9
B - Et - A - E (40-30-10-20) B - A - E (60-20-20)	9 + 10,5 11,4 + 12,5	10
B - Et - A - E (40-30-10-20) B - A - E (60-20-20)	10 12	10 a
B - Et - A - E (40-30-10-20) B - A - E (60-20-20) MCS - A - Tampon (50-10-40)	11,4 + 12 13 0,5 + 1	31
B - MEC - A - E (40-30-10-20)	10,2 + 13,5 (maxi)	8
Et - E (85-15)	6,9 + 11,9	2
Et - (Ac-F) - Tampon (49-1-50)	2 + 3,5	29
(IPMC) - M - E (30-30-40)	2 + 3	17
M - E (85-15)	9,4 + 13,4	1
M - E (50-50)	1,5 + 3	12
M - A - E (35-15-50)	2,1 + 3	19
M - A - E (45-5-50)	2 + 3,2	20
M - E (50-50)	1 + 2 + 2,5	23
B - Et - A - E (40-30-10-20)	9,9 + 12	
MCS - E (50-50)	2 + 3	14
MCS - M - E (25-25-50)	2 + 2,9	16
MCS - A - E (40-20-40)	2 + 3	21
MCS - A - E (50-10-40)	2 + 3,1	22
M - AcF - Tampon (48-2-50)	2 + 3	27
MCS - A - Tampon (50-10-40) B - Et - A - E (40-30-10-20) B - A - E (60-20-20)	1 + 2 11 13,4	30
P - E (80-20)	10,5 + 12,4	3
P - A - E (48-2-50)	1,9 + 3	28

ABREVIATIONS UTILISEES

A = ac. acétique
Ac = acétone
Am = alc. amylique
(AcF) = acide formique
(A/Et) = acétate d'éthyle
AN = acétonitrile
B = n-butanol
E = eau
Et = éthanol
IAm = alcool iso-amylique
I-P = isopropanol
(IPMC) = iso-propyl méthyl-cétone
M = méthanol
MEC = Méthyl-éthyl-cétone
MCS = méthyl cellosolve = éther mono méthyl. de l'éthylène-glycol
P = n-propanol

Tableau 6 - Propriétés chromatographiques des oses libres avec les éluants indiqués au tableau 5 sur plaques de gel de silice tamponnées. Les mobilités sont exprimées relativement à celle du digitoxose dont le Rf est précisé en dernier lieu.

Eluants	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	31	30
Glycogène	-	0,17	0,16	0,15	0,14	0,17	-	0,15	0,14	0,13	0,17	-	-
Amyloses	0,14	-	0,16	0,16	0,14	0,17	-	0,15	-	0,13	0,17	-	0,27
Amylopect.	-	0,16	0,15	0,15	0,15	0,18	-	0,15	-	0,13	0,17	0,22	-
Stachyose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,17	-	-
Ac. glucuron.	0,33	0,20	0,19	0,15	0,17	0,31	0,27	0,15	0,24	0,27	0,27	-	-
Raffinose	0,26	0,21	0,22	0,15	0,15	0,29	0,32	0,19	0,22	0,25	0,25	0,26	0,32
Mélibiose	0,26	-	0,22	-	0,23	0,30	-	0,18	-	0,25	0,28	0,25	0,32
Gentiobiose	-	-	0,24	0,17	0,17	0,31	-	0,19	-	0,29	0,22	0,27	0,27
Palatinose	0,52	0,33	0,32	-	-	0,41	0,44	0,24	0,34	0,38	0,36	0,35	0,40
Tréhalose	0,55	0,33	0,29	0,18	0,17	0,38	0,42	0,21	-	0,35	0,36	-	-
Maltose	0,54	-	0,30	0,25	0,18	0,40	-	0,21	-	0,36	0,37	0,35	0,39
Galactose	-	-	-	0,24	0,23	0,43	-	0,25	-	0,44	0,40	0,40	0,43
Saccharose	0,61	0,41	0,37	0,20	-	0,45	0,48	0,23	0,37	0,41	0,41	0,42	0,44
Arabinose	0,61	-	0,41	0,33	0,30	0,53	-	0,31	-	0,51	0,53	0,50	0,48
Glucose	0,62	0,41	0,37	0,21	0,23	0,49	0,52	0,28	0,41	0,47	0,45	0,47	0,43
Fructose	0,62	0,45	0,41	0,30	0,29	0,54	0,56	0,30	0,44	0,52	0,50	0,51	0,55
Mannose	-	-	-	0,29	-	0,54	-	0,30	-	0,55	0,49	0,51	0,51
Ribose	-	0,53	0,52	0,47	0,41	0,63	0,63	0,38	0,54	0,61	0,64	-	-
Xylose	0,79	0,63	0,53	0,42	0,39	0,78	0,63	0,36	0,53	0,64	0,57	0,61	0,58
Rhamnose	0,94	0,89	0,79	0,64	0,62	0,80	0,65	0,60	0,76	0,83	0,78	0,80	0,72
Désoxy-rib.	0,91	-	0,82	0,76	0,98	0,84	-	0,68	-	0,93	0,84	0,83	0,75
Digitoxose	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Rf. dig.	0,91	0,83	0,74	0,91	0,89	0,92	0,80	0,73	0,87	0,96	0,72	0,83	0,76

Tableau 7 - Propriétés chromatographiques des oses-Phosphorylés sur couches de sillice tamponnées. Les mobilités sont indiquées relativement à celle du digitoxose (cf. tableaux 7 et 8).

Oses-P	Eluant 31	Eluant 30
Fructose 1-6-di-P	0,17	0,19
Glucose-6-P	0,20	0,21
Glucose-1-P	0,21	0,22
Fructose-6-P	0,22	0,25

b) Glucides de l'hémolymphe d'Aedes.

Ce travail constitue une phase complémentaire à la thèse que M. NIZEYIMANA doit soutenir fin 84. L'hémolymphe du moustique contient essentiellement du tréhalose et du glucose, ce dernier étant, comme chez les autres insectes, le moins concentré. Il apparait également, à l'analyse, une autre fraction de plus faible mobilité, (Z_3), que certains auteurs ont assimilé, chez l'adulte, à l'acide glucuronique (1).

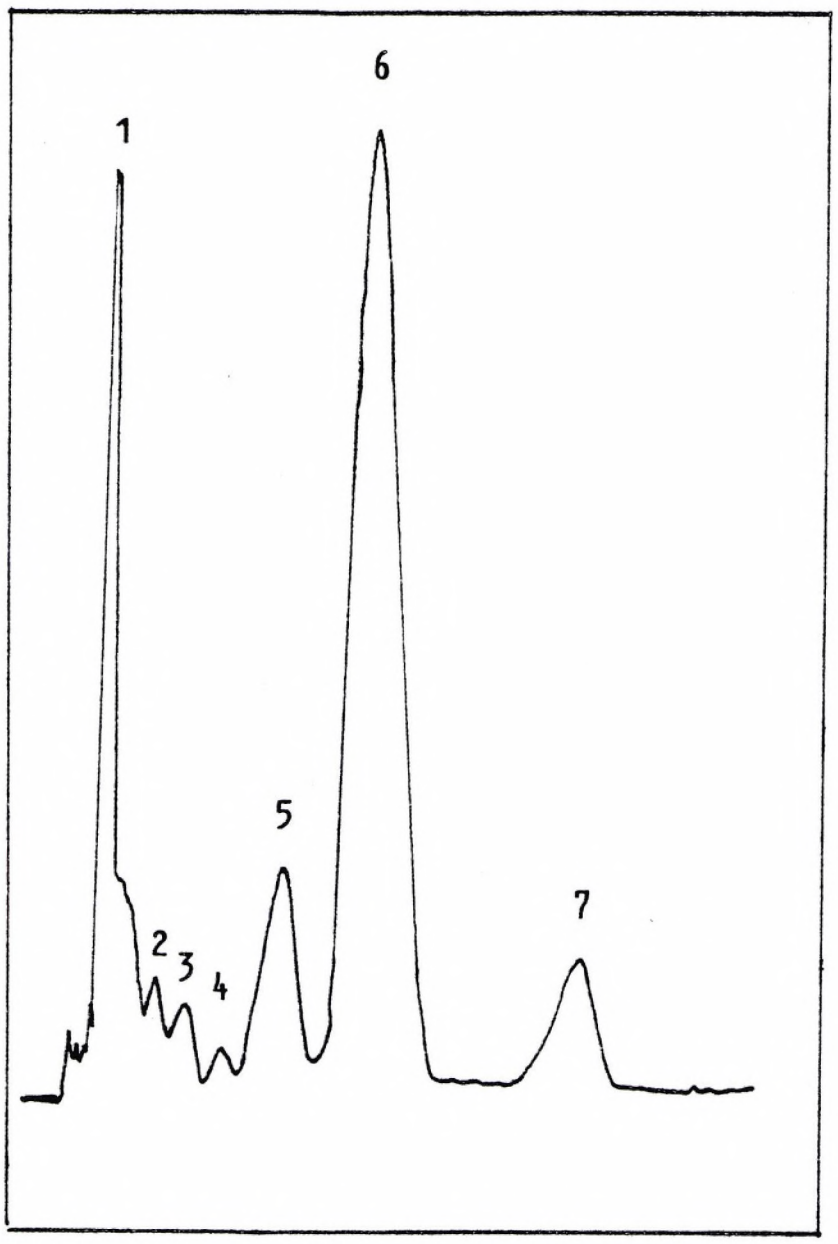


Fig. 23 - Chromatogramme des glucides de l'hémolymphe de larves d'Aedes : enreg. λ 540 nm.

1 - Glycogène
2 - Type stachyose
3 - Z_1 non identifié
4 - Z_2 non identifié
5 - Z_3 non identifié
6 - Tréhalose
7 - Glucose

Toutefois, après révélation au N(1)naphtyl-éthylène-diamine-dichlorure (NEDIAC)(2), l'acide glucuronique étalon se distingue par une coloration marron, tandis que le composé Z_3 présente la coloration violette caractéristique des oses vrais. La comparaison des spectres d'absorption mesurés sur plaques confirme la différence pressentie entre ces deux composés (fig. 24). Il en résulte soit que ce composant a été identifié par erreur à l'acide glucuronique dont il a la même mobilité avec divers éluants, soit que les larves ont une composi-

(1) MACK et al., 1979, J. Parasitol., **65**, 217-221
(2) BOUNIAS, 1980. Analyt. Biochem., **106**, 291-295

tion différente de celle des adultes. Sous l'action de la toxine les concentrations des fractions de haute polarité (Z_1, Z_2 et la fraction analogue au stachyose) ont tendance à augmenter.

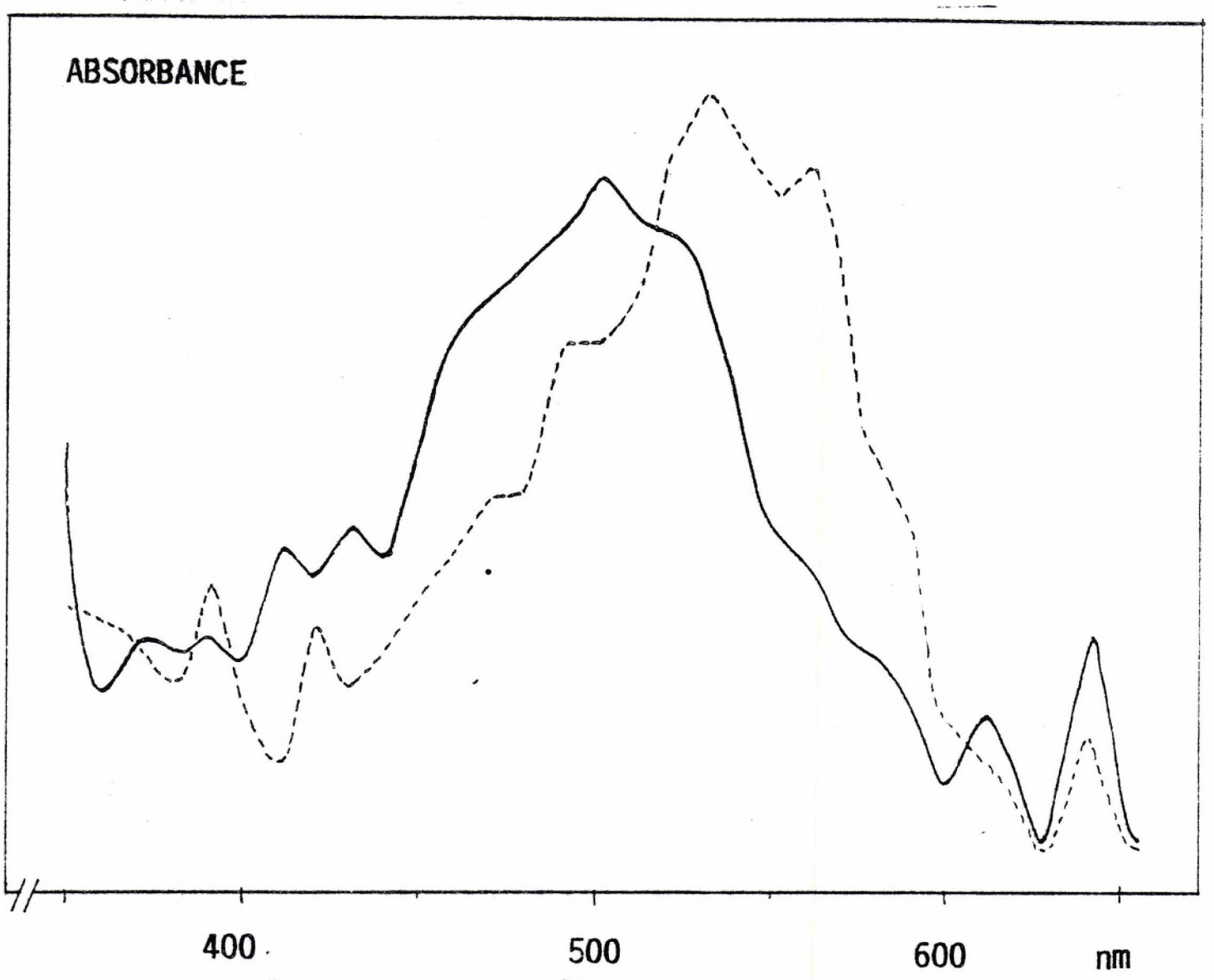


Fig. 24 - Comparaison du spectre du composé non identifié (Z_3) isolé à partir de l'hémolymphe d'Aedes (----) à celui de l'acide glucuronique étalon (——).

IV-2 - Projets de Recherches.

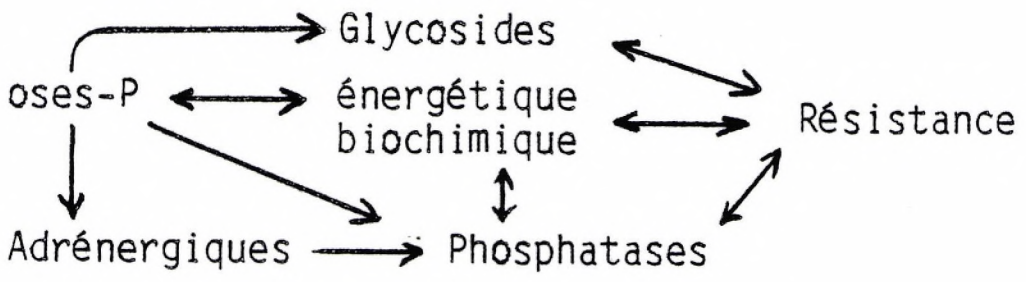
L'analyse des glucides devrait être étendue à l'étude des glycosides : la glycosylation figure, en effet, parmi les voies les plus importantes de la détoxification, aussi bien chez les Animaux que chez les Végétaux. On a même constaté que des éliciteurs naturels de résistance des végétaux aux pathogènes (ac. gras C20:4 et C20:5) induisent la formation de terpénoïdes fongitoxiques et l'inhibition de glyco-alcaloïdes stéroïdiens (1), tandis que des glycosides particuliers s'accumulent dans les parois de végétaux infestés (2). Il est important de noter que des polyholosides complexes sont eux-mêmes des éliciteurs naturels de résistance (3), et que des galactolipides

(1) ELEFTHERIOS et al., 1982. Science, **217**, 542-544
(2) ESQUERRE-TUGAYE, 1979. Thèse d'Etat
(3) KEEN et al., 1983. Plant Physiol., **71**, 466-471.

(galactosyl-diglycérides) interviennent dans le fonctionnement du photosystème I (1).

Les mécanismes de toxicité et résistance impliquent également les **oses-phosphorylés**, substrats inducteurs potentiels de **phosphatases** (cf 2ème partie chap I-2). Or, nous savons depuis peu que celles-ci sont liées au fonctionnement des **adrénorécepteurs** (2) dont nous étudions les mécanismes chez l'Insecte, et dont nous envisageons de transposer l'étude depuis longtemps chez les Végétaux.

Nos projets visent donc à intégrer dans un même schéma physiologique :



(1) KRUPA et al., 1975. BBA, **408**, 26-34
(2) MARY et al., 1981. Br. J. Pharmac., **72**, 8-9

Troisième partie

BIOCHIMIE THANATOLOGIQUE

Ce secteur d'activité est orienté vers toutes les manifestations biochimiques touchant -de près ou de loin- à la cessation des mécanismes de la vie, donc à l'agonie et à la mort. Il faut concevoir le sujet dans ses implications directes et réciproques: directes dans le cas où la mort est un objectif (effets intentionnels de pesticides) et réciproques dans le cas des recherches sur la prévention des effets non-intentionnels. Les recherches en cours débouchent sur des voies d'étude des phénomènes de **résistance**, dont les manifestations sont évidemment favorables dans le second cas et défavorables dans le premier ...

L'éthique première du Laboratoire de biochimie est orientée dans le sens de la protection, mais la réciproque fait aussi partie de sa mission, surtout lorsqu'il s'agit d'agents thanatogènes hautement spécifiques, tel que la toxine du Bacillus thuringiensis.

I - EFFETS BIOCHIMIQUES SUBLETAUX DE PYRETHROIDES CHEZ L'ABEILLE.

(M. BOUNIAS, avec la collaboration de Mme DUJIN et du Professeur POPESKOVIC, (1) ainsi que du Professeur R. DOWNER (2)).

Cette première phase de recherches, correspondant à l'action de la deltaméthrine injectée à la dose de 0,1 picomole par abeille (soit l'équivalent de 90 nanomoles par Kg, environ le centième de la DL50 chez la mouche), est maintenant achevée.

Les principaux résultats numériques sont résumés dans les tableaux 8 à 13.

(1) Université de Belgrade, Yougoslavie
(2) Université de Waterloo, Canada

To	Trehalose mM		Glucose mM	
	34.6 ± 4.6		2.47 ± 0.41	
	Controls	Deltamethrin	Controls	Deltamethrin
10 min	23.9 ± 8.0	49.8 ± 6.3	1.90 ± 0.70	2.25 ± 0.10
30 min	40.0 ± 17.2	15.6 ± 1.8	2.44 ± 0.39	1.63 ± 0.13
1 hour	36.4 ± 4.2	24.0 ± 3.5	2.60 ± 0.74	2.02 ± 0.37
1h30 min	47.4 ± 8.3	43.8 ± 5.9	2.25 ± 0.25	2.22 ± 0.74
2 hours	23.5 ± 3.2	19.9 ± 4.0	1.97 ± 0.27	2.00 ± 0.40
3 hours	22.7 ± 3.2	12.2 ± 3.2	2.24 ± 0.20	1.74 ± 0.54

Tableau 8 - Variations de la glycémie après injection de deltaméthrine ou du solvant seul. To=glycémie naturelle initiale.

	Phospholipids (mM)		Steroids (mM)	
	Controls	Deltamethrin	Controls	Deltamethrin
To	0.46 ± 0.062	0.49 ± 0.067	0.19 ± 0.06	0.18 ± 0.030
0H10 min	0.39 ± 0.052	0.51 ± 0.070	0.13 ± 0.03	0.21 ± 0.034
0H30 min	0.45 ± 0.062	0.47 ± 0.064	0.19 ± 0.05	0.11 ± 0.018
1 hour	0.40 ± 0.054	0.48 ± 0.064	0.21 ± 0.05	0.15 ± 0.027
1H30 min	0.47 ± 0.065	0.55 ± 0.074	0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.031
2 hours	0.26 ± 0.064	0.54 ± 0.074	0.14 ± 0.00	0.15 ± 0.025
3 hours	0.39 ± 0.054	0.53 ± 0.072	0.11 ± 0.02	0.13 ± 0.021

Tableau 9 - Variations de la lipémie (Phospholipides) après injection de la deltaméthrine ou du solvant seul. To = glycémie naturelle initiale.

	Free fatty acids (uM)		Monoacylglycerols (uM)	
	Controls	Deltamethrin	Controls	Deltamethrin
To	28.3 ± 5.7	34.0 ± 6.8	3.8 ± 0.24	4.2 ± 0.8
0H10 min	45.9 ± 9.3	45.0 ± 9.0	8.8 ± 0.56	10.0 ± 2.0
0H30 min	51.4 ± 10.4	29.0 ± 5.8	10.6 ± 0.68	0.44 ± 0.08
1 hour	33.5 ± 6.8	27.0 ± 5.4	11.6 ± 0.74	183.0 ± 36.7
2 hours	15.5 ± 5.1	198.0 ± 39.6	3.2 ± 0.49	210.0 ± 42.0
3 hours	45.2 ± 0.1	24.7 ± 4.9	1.77 ± 0.23	3.0 ± 0.7

Tableau 10 - Variations de la lipémie (acides gras et monoacyl-glycérols) après injection de deltaméthrine naturelle initiale.

	"Regular" Triacylglycerols (µM)		Atypical triacylglycerols	
	Controls	Deltamethrin	Controls	Deltamethrin
To	3.7 ± 1.0	3.8 ± 0.8	-	-
0H10 min	2.0 ± 0.96	3.2 ± 0.6	-	-
0H30 min	3.3 ± 0.7	2.5 ± 0.5	-	-
1 hour	2.1 ± 0.4	2.5 ± 0.5	-	-
1H30 min	3.4 ± 0.7	33.0 ± 6.6	44.0 ± 9.2	37.0 ± 18.3
2 hours	3.9 ± 0.4	30.0 ± 6.0	121.0 ± 25.4	162.0 ± 34.0
3 hours	2.6 ± 0.5	23.2 ± 1.4	29.8 ± 9.0	5.3 ± 0.2

Tableau 11 - Variations de la lipémie (triacyl-glycérols) après injection de deltaméthrine ou du solvant seul. To = glycémie naturelle initiale.

	Diacyl 1-2 glycerols (µM)		Diacyl 1-3 glycerols (µM)	
	Controls	Deltamethrin	Controls	Deltamethrin
To	21.6 ± 2.2	42.0 ± 6.4	7.4 ± 1.0	5.1 ± 2.8
0H10 min	11.0 ± 4.4	60.0 ± 7.7	4.2 ± 2.3	7.1 ± 3.5
0H30 min	7.1 ± 0.74	19.3 ± 3.8	6.2 ± 3.4	0.9 ± 4.5
1 hour	27.0 ± 10.0	22.8 ± 7.4	6.9 ± 3.8	2.16 ± 1.0
1H30 min	38.5 ± 23.5	60.5 ± 10.8	8.7 ± 4.8	4.2 ± 2.1
2 hours	24.8 ± 4.3	32.6 ± 18.0	3.1 ± 0.7	5.1 ± 2.5
3 hours	30.5 ± 8.7	18.2 ± 9.7	3.9 ± 2.1	4.5 ± 1.3

Tableau 12 - Variation de la lipémie (diacyl 1-2 et 1-3 - glycérols) après injection de deltaméthrine ou du solvant seul. To = glycémie naturelle initiale.

Time (N)	Maximum velocity V_M=uM.mn^{-1} per gut (per mg)	Dissoc. constant K mM	V_M / K x10-3.mn^{-1}.gut^{-1} (x10-3mn^{-1}.mg^{-1})	Hill Coefficient n
To (N=6)	5.85 ± 1.0 (0.67)	5.45 ± 1.76	1.07 ± 0.39 (0.12)	0.83 ± 0.12
0h10 min (N=6)	5.94 ± 0.50 (0.65)	10.4 ± 2.2	0.57 ± 0.14 (0.063)	0.80 ± 0.07
0h30 min (N=5)	6.15 ± 0.54 (0.57)	7.71 ± 1.83	0.79 ± 0.20 (0.074)	0.83 ± 0.08
1 hour (N=6)	7.54 ± 1.45 (0.87)	7.37 ± 1.92	1.02 ± 0.36 (0.12)	0.80 ± 0.06
1H30 min (N=6)	3.34 ± 0.32 (0.53)	4.04 ± 0.63	0.83 ± 0.18 (0.13)	0.96 ± 0.05
2 hours (N=6)	26.4 ± 6.4 (2.27)	29.58 ± 9.38	0.89 ± 0.37 (0.076)	0.66 ± 0.07
3 hours (N=5)	6.96 ± 1.29 (1.0)	10.49 ± 2.21	0.66 ± 0.21 (0.096)	0.84 ± 0.04

Tableau 13 - Paramètres cinétiques des phosphatases alcalines intestinales d'Abeilles après injection de deltaméthrine (0,1 p. mole par individu).

L'action de la deltaméthrine n'est guère significative en ce qui concerne le tréhalose, le glucose, les phospholipides, les stéroïdes et les diglycérides.

Les monoglycérides montrent un pic (4.357%) 1 heure après injection, suivis (à 1h30) par les acides gras libres "courants", les diglycérides 1-2 et les triglycérides courants. Au bout de 2 heures les monoglycérides augmentent encore, et les triglycérides "courants" amorcent une baisse tandis qu'apparaît un pic de triglycérides atypiques, de polarité inférieure. Enfin, 3 heures après injection apparaîssent des composés de polarité correspondant à celle des cérides, absents dans les insectes sains. L'étude détaillée des paramètres cinétiques d'activité phosphatasique fait apparaître un important "accident" 2 heures après injection : la vitesse maximale (V_M) augmente de 450% ainsi que la constante de dissociation (K) d'un facteur f_i très voisin : 540%. Le phénomène correspond à une "activation compétitive" pouvant s'interpréter comme une stimulation de la production d'enzyme libre, destinée à compenser **exactement** un état d'inhibition compétitive. Il est important de remarquer une baisse préalable de (V_M) (-43%) au temps To + 1h30, avec une légère diminution de (K) (-26%). Le coefficient de Hill augmente, au contraire, légèrement à 1h30, pour approcher du seuil "michaëlien, puis il s'abaisse 2h après injection où il est inférieur de 20% à la valeur initiale. Il y a alors renforcement du caractère de coopérativité négative.

L'intégration de l'ensemble de ces données relativement aux connaissances actuelles sur le métabolisme des insectes permet d'interpréter les traumatismes biochimiques observés selon le schéma général de la figure 25.

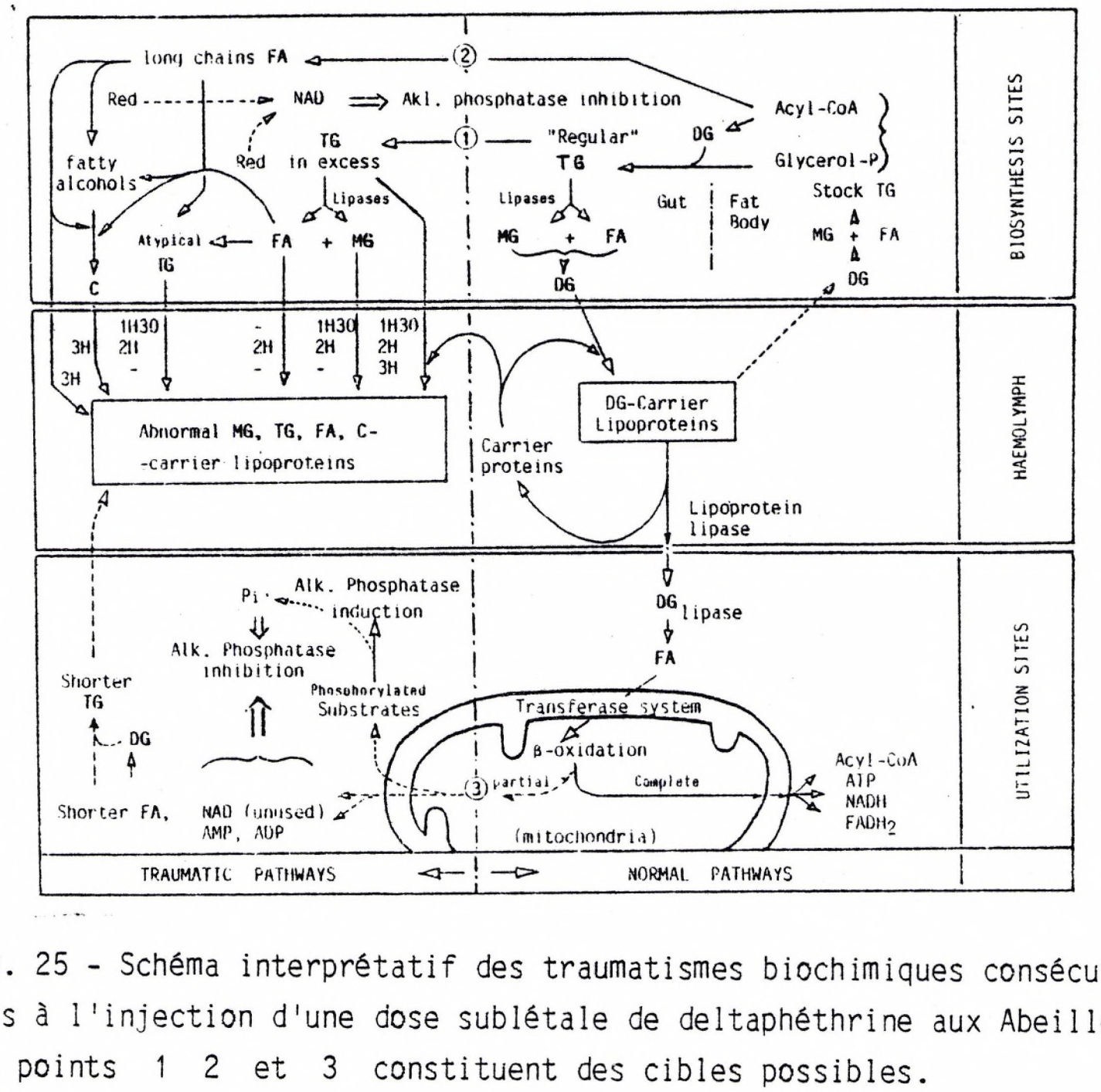


Fig. 25 - Schéma interprétatif des traumatismes biochimiques consécutifs à l'injection d'une dose sublétale de deltaphéthrine aux Abeilles. Les points 1 2 et 3 constituent des cibles possibles.

II - EFFETS BIOCHIMIQUES COMPARES DU JEUNE ET D'UNE INFECTION BACTERIENNE CHEZ LE GRILLON (Mme B. DACLINAT (1), C.P. VIVARES (1), C. VAGO (1) et M. BOUNIAS : non publié).

Ce travail est en voie d'achèvement et constitue une partie de la thèse de 3e cycle que doit soutenir Mme Daclinat au cours du 1er semestre 1984.

Les glucides (tréhalose, glucose) et les lipides (phospholipides, acide gras, diacyl 1-2 et 1-3 glycérols, triacyl glycérols, stéroïdes libres) ont été analysés simultanément dans l'hémolymphe et le corps adipeux d'un orthoptère : Gryllus bimaculatus de GEER dans les conditions suivantes :

a) conditions de jeûne

aux temps : 0 (témoins), 3 jours, 5 jours, 7 jours et 10 jours. Les oscillations observées dans l'hémolymphe et le corps adipeux, pour le glucose, et dans l'hémolymphe pour le tréhalose (qui s'épuise rapidement dans le tissu adipeux) témoignent des remarquables capacités de **régulation** de l'Insecte. Les lipides s'épuisent dans l'hémolymphe tandis que le tissu adipeux montre un pic de phospholipides (x10) et de stéroïdes (x300) après 5 jours et un pic de triglycérides (x75) dès le 3e jour.

b) Conditions d'infection.

Les analyses effectuées 3 jours, 5 jours, 10 jours et 15 jours après infection montrent certaines analogies avec le jeûne. Les variations paraissent "en phase" en ce qui concerne les lipides, mais en opposition de phase dans le cas des glucides.

L'interprétation des résultats se poursuit au cours des visites réciproques de MM. VIVARES et BOUNIAS.

(1) Université de Montpellier.

III - EFFETS BIOCHIMIQUES DE LA TOXINE DU Bacillus thuringiensis SUR LES LARVES DE Aedes aegypti.

(B. NIZEYIMANA (1), C. VAGO (1) et M. BOUNIAS).

Ces recherches doivent conduire Monsieur NIZEYIMANA à la soutenance d'une thèse de Doctorat de 3e cycle au cours du 2e semestre de 1984.

Après les premiers travaux sur les effets morphopathogènes et cytopathogènes de Bacillus thuringiensis var. israelensis sur Aedes aegypti (L.)(DIPTERE, CULICIDE) à l'aide des microscopes électroniques à transmission et à balayage ainsi que la caractérisation des glucides complexes par la cytochimie approfondie des différents tissus, nous avons jugé très utile d'approfondir l'étude des différents métabolites de l'hémolymphe des larves d'Aedes aegypti à l'aide d'une méthode de micro-analyse mise au point par M. BOUNIAS.

Les travaux réalisés jusqu'ici ont permis d'une part de faire des estimations qualitatives et quantitatives des différents composants en glucides et amino-acides libres de l'hémolymphe ainsi qu'en lipides du corps adipeux de ce moustique, et d'autre part, de suivre les variations dans le temps sous l'action des différentes doses de toxine.

Les résultats d'analyse des glucides à partir d'un volume très faible (0,2 µl) d'hémolymphe montrent la présence du tréhalose ; sucre le plus abondant, suivi du glucose ainsi que 3 autres sucres de faible mobilité chromatographique présentant des propriétés analogues à celles du glycogène, du stachyose, du mélibiose et du gentiobiose, mais dont l'identification n'est pas considérée comme définitive.

Le corps adipeux contient par ordre d'importance décroissante les triglycérides, phospholipides, acides gras et stéroïdes libres ainsi que quelques traces de monoglycérides et diglycérides 1-2.

La complémentarité des plaques de silice et de cellulose ainsi que l'association de plusieurs combinaisons d'éluants nous ont permis

(1) Université de Montpellier.

une large gamme de séparations d'amino-acides d'Aedes aegypti . Ainsi une vingtaine d'amino-acides ont pu être séparés, identifiés et dosés quantitativement.

Les larves d'Aedes aegypti ont été soumises aux concentrations de 1 mg/l ; 0,1 mg/l ; 0,02 mg/l ; 0,01 mg/l de l'endotoxine de B. thuringiensis sérotype H-14 (formulation 1.476 titrant 12.000 U.T.I.) ; ce qui correspond sensiblement aux $10xDL_{100}$; DL_{100} ; DL_{50}; DL_{10} respectivement. Les variations de tous ces composants biochimiques ont été suivies dans le temps jusqu'à l'état de fragilisation irréversible des larves conduisant à la mort de celles-ci pour chacune de ces concentrations. Les analyses ont été effectuées de 30 mn jusqu'à 36 h. après le début du traitement.

Ces travaux sont en cours d'approfondissement et nous espérons donner un bilan physiopathologique complet de l'action de ce sérotype H-14 de Bacillus thuringiensis sur Aedes aegypti avant la fin de l'année 1984.

IV - PROJETS DE RECHERCHES.

IV-1 - Pyréthroïdes - Dans un premier stade, l'étude devrait se poursuivre avec la comparaison des cinétiques d'effets biochimiques à diverses doses (comme dans le cas du BTi), puis avec une étude particulière de l'action du produit sur les diglycérides-lipases qui contrôlent le transfert par l'hémolymphe. Il serait également important de savoir quelles sortes de phosphatases sont impliquées dans les manifestations de toxicité (cf 2e partie, chap. I-2).

Dans une seconde phase, il serait intéressant de comparer les résultats précédemment obtenus avec ceux d'autres types de molécules pyréthroïdes, dans une optique de relations structure/activité (collaboration avec le laboratoire des médiateurs chimiques).

IV-2 - Sémiologie biochimique générale.

Nous envisageons de préparer, chez l'insecte (en parallèle à ce qui est déjà en cours chez les végétaux), un programme de recherche des symptômes biochimiques caractéristiques de dismétabolismes

précis, obtenus à l'aide d'inhibiteurs spécifiques des grandes fonctions biochimiques. Ce projet a pour but de doter le laboratoire d'une sorte de banque de données écotoxicologiques. Sa préparation logistique est parfaitement au point, grâce aux travaux déjà réalisés dans le domaine endocrinologique.

IV-3 - Autres toxiques agrochimiques.

Les représentants les plus caractéristiques de chaque classe de pesticides devraient être classés d'après leurs effets sémiologiques biochimiques. Le choix des molécules dépendrait de l'importance de leur utilisation dans la pratique agricole. Rien n'interdit de penser qu'il ne serait pas possible de découvrir des caractéristiques spécifiques permettant de retrouver, à partir d'Abeilles affaiblies mais vivantes, quelle catégorie de toxique peut être incriminée (alors que les individus n'en contiendraient que des traces non décelables). Ces recherches seraient également d'un grand intérêt en expertises juridiques.

Quatrième partie

BIOCHIMIE PHYTO-SEMIOLOGIQUE

I - CARACTERISATION DES TRAUMATISMES BIOCHIMIQUES VEGETAUX.

(M. BOUNIAS).

L'analyse des traumatismes biochimiques chez les Insectes et chez les Végétaux constitue l'un des objectifs généraux du Laboratoire de Biochimie.

L'utilisation massive d'agents chimiques dans l'agriculture moderne entraîne inévitablement des accidents de plus en plus nombreux, généralement classés dans la catégorie des "effets non intentionnels".

Il en est ainsi de l'action de pesticides sur la faune "utile" (Abeille et autres pollinisateurs, auxiliaires parasites et prédateurs de ravageurs, gibiers, animaux domestiques, espèces protégées) ou d'herbicides sur des plantes cultivées, et de façon plus générale sur l'Environnement. D'autres cas moins évidents peuvent aussi se présenter, par exemple l'effet secondaire négatif d'un fongicide ou d'un insecticide sur la plante-hôte qu'il est supposé protéger de l'infection par un champignon ou de l'attaque par un insecte parasite. Les nombreux procès en cours entre les organisations d'agriculteurs et les firmes phyto-sanitaires témoignent également de la nécessité de développer des recherches de type "éco-toxicologique" en vue de l'étude objective de ces problèmes, en premier lieu au titre de la connaissance scientifique, mais également aux fins d'expertises.

"L'événement de Trans-en-Provence" en illustre un exemple tout à fait particulier, puisqu'il s'applique précisément au cas le plus difficile : celui de l'analyse de traumatismes consécutifs à un événement de nature non identifiée. Le résumé suivant est tiré du mémoire final complet, dont nous donnons également le sommaire, puis certains extraits d'intérêt général.

I-1 - Etude des dismétabolismes consécutifs à un phénomène d'origine inconnue.

(Contrat INRA/CNES 1981 : n°80.0796 et 1983 : n°83.009

Sommaire

Avant Propos.

Première partie : Analyse des échantillons prélevés en 1981.

I - Introduction 1
II - Prélèvements d'échantillons
III - Techniques 3
IV - Résultats.
A - Pigments photosynthétiques 3
B - Dérivés chlorophylliens particuliers 13
C - Co-facteurs photosynthétiques 17
D - Lipides non photosynthétiques 19
E - Glucides 24
F - Amino-acides 30
G - Enzymologie : 1 - Phosphatases 38
2 - Enzymes de mélanisation 39

Deuxième partie : Analyses effectuées sur le même site.
en 1983 (contrôles)

OBJECTIFS 41
RESULTATS
A - Pigments photosynthétiques 43
B - Glucides 44
C - Amino-acides 46
D - Enzymologie 49
E - Propriétés du sol 50

Troisième partie : Analyse statistique comparée des résultats
de 1981 et 1983.

Introduction 51
Principes généraux 52
Résultats 58
Discussion : A - Glucides 68
B - Amino-acides 72
C - Enzymologie 76

Quatrième partie : Analyse physiologique des résultats.
Introduction 79
Inter-relations biochimiques :
A - Chlorophylle A / Chlorophylle B 80
B - Chlorophylles/Caroténoïdes 81
C - Chlorophylles/Amino-acides 83
D - Caroténoïdes/Amino-acides 87
E - Glucides/Chlorophylles 89
Conclusions 91

Cinquième partie : Comparaison avec des traumatismes biochimiques d'origines déterminées.
Introduction
A - Radiations ionisantes 93
B - Facteurs d'éclairement 93
C - Inhibitions du métabolisme glucidique 94
D - Inhibition des Méthyl-transférases 95
E - Inhibition des oxydations phosphorylantes 95
F - Inhibition de la synthèse protéique 96
G - Inhibition de la photophosphorylation 96
H - Effecteurs naturels 97
I - Traumatismes hydriques 97
J - Traumatismes thermiques 98
Discussion 101
Propositions de Recherches 102

CONCLUSION GENERALE 103

RESUME 104

RESUME DES TRAVAUX DE RECHERCHES.

Un phénomène aérospatial d'origine inconnue, décrit par un témoin en 1981, a fait l'objet d'enquêtes de la Gendarmerie Nationale et du Centre National d'Etudes Spatiales (GEPAN). Des prélèvements de végétaux ont été effectués dans le but d'analyser l'impact éventuel du phénomène sur la cellule vivante.

Une méthode spécialement adaptée aux conditions écologiques naturelles a été élaborée : elle consiste à prélever une série d'échantillons de plantes d'une même espèce, le long d'un axe topographique passant par l'épicentre (constaté ou supposé) du phénomène. Les prélèvements doivent pouvoir être répartis d'un point situé aussi près que possible de l'épicentre jusqu'à des distances de plus en plus éloignées, mais sur le même biotope. Le choix du matériel est donc déterminé par les possibilités écologiques offertes sur le site. Dans le cas présent, l'espèce la plus favorable était une luzerne sauvage : Medicago minima.

Les analyses biochimiques ont porté sur l'équipement pigmentaire photosynthétique (7 à 12 composants), les lipides généraux (11 composants), les glucides (18 composants), les amino-acides libres (19 composants) et les phosphatases alcalino-neutres. Le premier échantillonnage effectué aussitôt après l'événement (J+1) se composait d'1 prélèvement sous une trace visible (d=1,5m de l'épicentre) et d'un témoin à d=20m. Le deuxième (J+40) se composait de 5 prélèvements correspondant aux distances : d=0 ; 1,5m ; 2,1m ; 3,5m ; 10m. Enfin, une 3e série de prélèvements a été effectuée en 1983, soit exactement 2 ans plus tard, le long du même axe et à des distances : d=0,5m ; 3,85m ; 6m ; 8,8m ; 15,4m (imposées par la localisation des stations végétales).

L'étude scientifique du problème se décompose en 5 étapes.
I - Analyse des composants biochimiques dans les échantillons de 1981. Les résultats ont fait apparaître des différences qualitatives et quantitatives entre la composition des plants les plus rapprochés de l'épi-

centre et celle des plus éloignés. Dans la première série de prélèvements, les concentrations des chlorophylles et caroténoïdes étaient abaissées de 30% en moyenne, le glucose de 25% et le fructose de 60 %; inversement, les acides aminés étaient globalement augmentés de 47% et le saccharose de 39%. Dans la 2e série, les échantillons situés à l'épicentre sont fortement apauvris en chlorophylle A (-72 %) et en caroténoïdes (- 52 %) mais beaucoup moins en chlorophylle B (-30 %). Les amino-acides sont globalement diminués (-21 %) ainsi que le fructose et le saccharose, tandis que le glucose subit une forte augmentation (+158 %). Les phosphatases alcalines montrent une augmentation de la vitesse maximale et une diminution (d'un même facteur) de la constante de dissociation.

Dans les deux séries, certains composants lipidiques caractéristiques de l'état de sénescence se trouvent accumulés dans les jeunes feuilles des plants les plus rapprochés de l'épicentre où apparaissent également des fractions glucidiques de faible masse molaire pratiquement absentes des échantillons les plus éloignés. Parmi les amino-acides, l'un des composants (non identifié) est absent des échantillons situés à l'épicentre où il est remplacé par une forme de polarité légèrement inférieure, elle-même absente des échantillons les plus éloignés.

En outre, il a été possible dans de nombreux cas de mettre en évidence une atténuation progressive des effets observés, en fonction de l'éloignement croissant de l'épicentre.

II - Analyse des échantillons de contrôle en 1983. L'analyse des pigments photosynthétiques, glucides, amino-acides et phosphatases a été répétée dans le but d'établir, sur le même site, à titre de référence, les limites et le sens de la variabilité naturelle. Les résultats ont montré que les effets observés en 1981 avaient disparu dans presque tous les cas, mais se maintenaient en ce qui concerne la vitesse maximale des phosphatases ainsi que les concentrations en certains composants, en particulier la proline.

Une analyse comparée du pH du sol autour des racines de chaque échantillon n'a fait apparaître aucune différence.

III - Analyse statistique comparée des résultats de 1981 et 1983.

L'analyse statistique des résultats s'est déroulée en trois phases successives.

La première a eu pour objet de déterminer la probabilité de signification des différences entre la variance établie en 1981 et celle observée en 1983, le long de l'axe écologique, pour chaque paramètre biochimique analysé. L'augmentation de variabilité associée à l'événement est hautement significative pour les chlorophylles et la lutéine, pour les triholosides, le glucose, la fraction correspondant au xylose, et pour d'autres fractions de type désoxy-hexoses ou didésoxy-hexoses. Parmi les acides aminés, la signification la plus élevée est observée dans le cas de la thréonine et de l'alanine puis à un degré moindre ($P < 0,2$) pour la sérine et le tryptophane. Toutefois, l'action du "traitement" peut aussi s'exprimer sans changement de la variabilité par une disposition particulière des points expérimentaux, selon un ordre déterminé, non attribuable au hasard : certaines de ces dispositions peuvent être caractérisées par les analyses de corrélation et regression.

La seconde phase concerne la probabilité de signification des corrélations entre la concentration de chacun des paramètres biochimiques et les distances depuis l'épicentre, en comparant les résultats de 1981 à ceux de 1983. Des corrélations positives hautement significatives ont été établies pour le βcarotène, la chlorophylle A et la lutéine qui décroissent vers l'épicentre. Le coefficient positif obtenu avec le fructose n'est pas significativement distinct de celui mesuré dans la série de contrôle. La corrélation négative, mesurée pour le glucose, est hautement significative après transformation des données en coordonnées semi inversées. Chez les amino-acides, les corrélations les plus significatives sont obtenues pour la proline, l'isoleucine, la leucine, le groupe (acide glutamique + glutamine), l'alanine, et à un moindre degré la lysine. Toutefois, les cas de la proline et de la lysine sont statistiquement identiques dans les séries de 1981 et les contrôles de 1983.

La troisième étape a permis de comparer entre elles les pentes de régression correspondant aux relations établies en 1981 et 1983, et à les comparer, enfin, à une pente théorique (hypothétiquement fortuite) calculée en supposant que l'intervalle de confiance de la moyenne de chaque paramètre biochimique s'exprime de manière opposée et maximale aux points extrêmes de l'axe écologique sur lequel se situent les

échantillons.

La signification des différences liées au phénomène observé est ainsi confirmée pour le βcarotène, la chlorophylle A et la lutéine, pour le glucose et pour un désoxy-pentose, de même que pour la proline, l'acide glutamique, la valine, l'isoleucine, ainsi que la leucine après transformation en coordonnées semi-inversées.

Dans les cas où la variabilité ne s'exprime pas sous forme de corrélation, certaines relations entre concentrations et distances montrent seulement un point accidentellement éloigné de la moyenne (donc non reliable au phénomène étudié), tandis que d'autres évoquent l'allure des relations doses/effets caractéristiques de l'action d'effecteurs allostériques (et peuvent donc lui être rattaché). C'est le cas des triholosides, du groupe xylose, et même du saccharose. Nous avons pu établir, entre ces trois cas, une triple corrélation hautement significative, ce qui éloigne l'hypothèse d'un phénomène fortuit. Des observations de même type ont été effectuées chez les amino-acides, où une relation hautement significative s'établit entre la thréonine et la sérine au cours de leurs variations. Dans le cas de la proline, de l'iso-leucine, de la lysine et du tryptophane, une analogie persiste entre les résultats de 1981) et ceux de 1983 lesquels, à leur tour ne peuvent être totalement expliqués par une corrélation "fortuite" ; ceci suggère, comme pour les phosphatases, soit la pré-existence, soit la rémanence d'un effecteur commun dont les manifestations s'exprimeraient de manière écologiquement superposable à celles du phénomène étudié.

IV - Analyse physiologique des résultats.

Des inter-relations entre composants biochimiques ont été établies expérimentalement sur des végétaux cultivés aseptiquement sur milieu synthétique, dans des conditions de température et d'éclairement contrôlées. Ces relations fonctionnelles sont caractéristiques de l'état d'équilibre métabolique de la cellule. Nous avons pu retrouver, dans les échantillons de contrôle de 1983, des relations très semblables (en dépit des conditions expérimentales non contrôlées) entre les chlorophylles, les caroténoïdes, les amino-acides et les glucides. Des corrélations positives rattachent les chlorophylles aux caroténoïdes et au glucose, tandis que des corrélations négatives sont établies entre les amino-acides et les chlorophylles ou les caroténoïdes.

Dans les échantillons de 1981, reliés à l'événement étudié, les relations normales entre amino-acides et chlorophylles ou caroténoïdes et entre chlorophylles et glucose sont encore respectées aussitôt après l'événement (J+1), mais les points sont situés au delà des zones "normales" leur localisation étant compatibles avec l'extrapolation des courbes témoins" : il s'agit donc d'un choc initial ayant repoussé les paramètres biochimiques vers des positions extrêmes mais toujours dans les limites de validité des lois établies. Par contre, dans les échantillons (J+40), les relations ci-dessus ne sont plus respectées et sont même inversées. Ceci traduit, au niveau des équilibres biochimiques cellulaires une importante désorganisation. Ces perturbations sont d'autant moins accentuées que les échantillons sont plus éloignés de l'épicentre du phénomène.

V - Comparaison avec des traumatismes biochimiques d'origines déterminées. Nous avons comparé les résultats ainsi obtenus avec les effets provoqués, au niveau des mêmes composants biochimiques et de leurs interactions, par des causes définies. Celles-ci peuvent être de nature physique ou chimique, et en l'état actuel, nous avons pu disposer des éléments de comparaisons suivants : action des radiations ionisantes ; action de l'éclairement : phénomènes d'étiolement en lumière atténuée ou à l'obscurité totale, et phases de reverdissement ; chocs hydriques par dessèchement ; chocs thermiques (hyperthermie sans combustion) ; inhibitions du métabolisme glucidique ; inhibition des méthyl-transférases (et de la bio-synthèse des pigments photosynthétiques) ; inhibition des oxydations phosphorylantes ; inhibition de la synthèse protéique ; inhibition de la photophosphorylation.

Au terme de cette analyse, l'effet primaire observé dans la première série d'échantillons (J+1) présente certaines analogies avec un affaiblissement du métabolisme glucidique par défaut d'éclairement, tandis que les symptômes caractérisés dans les échantillons de la 2e série (J+40) ne sont compatibles (sauf en ce qui concerne le fructose et le saccharose) qu'avec une atteinte des oxydations phosphorylantes. Ni les radiations ionisantes, ni les chocs thermiques ou hydriques ne peuvent expliquer de manière complète et cohérente les traumatismes observés.

En conclusion, cet ensemble de recherches a permis de dégager trois types de résultats : 1) les plantes les plus rapprochées de l'événement observé ont subi, au niveau des équilibres biochimiques cellulaires, des perturbations graves dont l'importance décroît en fonction de

L'éloignement de l'épicentre du phénomène et dont la nature n'est pas explicable par l'action des agents physiques et chimiques dont les effets ont été établis à partir des mêmes critères biochimiques.

D'autre part, le traumatisme initial continue à se manifester plusieurs semaines plus tard, après avoir évolué vers un état d'équilibre très différent. 2) Certaines perturbations ont été retrouvées, quoique atténuées, deux ans plus tard ce qui suggère soit l'intervention d'un effecteur antérieur, soit l'expression d'un effet rémanent. 3) Diverses anomalies apparaissent, enfin, comme fortuites, c'est-à-dire provoquées par des causes sans relation apparente avec le phénomène étudié.

Ce canevas de Recherches peut être appliqué à des problèmes liés à l'emploi de substances agrochimiques et plus généralement à toutes recherches ou expertises écotoxicologiques relatives à l'Agriculture ou à l'Environnement.

COMPTE RENDUS DE PRESSE

Avant même que paraisse le compte rendu final complet de ces travaux, la presse écrite, la radio et la télévision en ont relaté les premiers résultats, avec la participation de M. BOUNIAS à diverses émissions et interviews.

Radio France : France Inter : émission "Boulevard de l'Etrange" du 15-11 enregistrée le 28-10-83 chez M. BOUNIAS
émission "Adrénaline" du 23-2-84 (en direct)
+ autres émissions (références aux travaux)

T.F. 1 : émission "temps X" du 14-1-84 (filmée et enregistrée au Laboratoire)

Revues Hebdo : France-soir-Magazine
Ici Paris hebdo

Journaux : Times
Sunday express
France soir
Le quotidien du médecin
Le Méridional
Le Provençal
La Marseillaise
etc ...

Les principales données numériques figurent dans les tableaux nos 14 à 28 ci-joints.

Tableau 14 - Composition en pigments photosynthétiques des échantillons de la 3e série (1983). nmoles/mg de poids frais. Les moyennes ($\bar{x}$) et les écarts-types (s_x) sont calculés d'après N=7 mesures.

Composants	Distance (m) du point d'origine 0,50 $\bar{x}$ (s_x)	3,85 $\bar{x}$ (s_x)	6,0 $\bar{x}$ (s_x)	8,80 $\bar{x}$ (s_x)	15,40 $\bar{x}$ (s_x)	Moy. et variances générales (N=5) $\bar{x}$	s_x^2
β carotène	0,370(0,073)	0,325(0,085)	0,358(0,067)	0,246(0,061)	0,251(0,070)	0,31	0,0027
Chlorophylle A	0,891(0,423)	0,695(0,305)	0,693(0,402)	0,638(0,199)	0,646(0,378)	0,713	0,0085
Chlorophylle B	0,446(0,154)	0,412(0,105)	0,405(0,094)	0,401(0,177)	0,341(0,172)	0,401	0,0012
Chloroph. A'+B'	0,10	0,38	0,25	0,12	0,03	0,176	0,0155
Phéophytines A+B	1,706(0,544)	2,305(0,329)	1,833(0,351)	1,337(0,261)	1,297(0,340)	1,696	0,1356
Ph. A / Ph. B	0,06	0,03	0,05	0,06	0,05	0,05	0,0001
Lutéine	0,719(0,177)	0,712(0,186)	0,826(0,291)	0,617(0,236)	0,604(0,148)	0,696	0,0065
Dérivés polaires	1,222(0,531)	0,733(0,528)	1,021(0,446)	0,788(0,369)	0,817(0,496)	0,916	0,0329
TOTAL	5,464	5,562	5,386	4,147	3,986	4,909	0,479

Tableau 15 - Comparaison des moyennes et des variances des teneurs en pigments photo-synthétiques entre les séries (E_1) et les témoins. Le signe (+) indique une différence entre les moyennes générales des cas (E_1) et témoins.

Composants	Moyennes t	P(t)		Variances F_{-}	P(F)
β carotène	5,83	$0,04.10^{-3}$	+	2,228	0,228
Σ chlorophylle A	1,78	0,056	±	8,52	0,031
Σ chlorophylle B	7,29	$0,08.10^{-3}$	+	4,21	0,096
Phéophytines	5,47	$0,6.10^{-3}$	+	0,70	0,369*
Σ Chl. A/Phéoph.	2,44	0,04	+	48,6	10^{-3}
Lutéine	11,65	$2,6.10^{-6}$	+	11,49	0.018
Fractions polaires	3,26	0,011	+	1,787	0,294
* épreuve effectuées sur F^{-1}					

Tableau 16 - Analyse des paramètres de corrélation avec les distances dans le cas des pigments photosynthétiques des échantillons des séries exposées au facteur (E_1) et témoins. La dernière colonne exprime la probabilité associée à la comparaison des deux coefficients par la méthode de transformation en Z = arg.th.(ρ).

Composants	Séries exposées au facteur (E_1) $\rho(E_1)$	t (ν=3)	P(t)	Séries de contrôle ρ_0	t (ν=3)	P(t)	$P(\varepsilon_t)$
β Carotène	0,900	3,576	0,037	-0,331	2,587	0,081	0,008
Σ Chlorophylle A	0,844	2,725	0,072	-0,765	2,057	0,132	0,024
Σ Chlorophylle B	-0,071	0,123	0,909	-0,977	7,936	0,004	-
Σ Phéophytines	-0,022	0,038	0,972	-0,660	1,522	0,225	-
Chl. A / Phéo. A	0,975	7,688	0,004	0,253	0,452	0,681	0,054
Lutéine	0,983	9,273	0,003	-0,614	1,347	0,271	0,002
Fractions polaires	0,568	1,195	0,318	-0,565	1,186	0,321	0,200

Tableau 17 - Analyse comparée des paramètres de régression dans le cas des pigments photosynthétiques des séries d'échantillons exposées au facteur (E_1) et témoins.

Composants	Pentes			Comparaisons des pentes (v=3)			
				$b\varepsilon_1/b_o$		b/br (*)	
	$b\varepsilon_1$	b_o	br	t	P(t)	t	P(t)
β Carotène	0,065	-0,027	±0,047	5,15	0,014	2,11	0,125
Σ Chlorophylle A	0,092	-0,019	±0,036	3,36	0,043	1,69	0,189
Σ Chlorophylle B	-0,0033	-0,017	±0,024	0,456	0,679	-	(**)
Σ Phéophytine	$-0,06.10^{-3}$	-0,001	±0,063	0,591	0,596	-	(**)
Chl. A / Phéo.	0,1142	+0,0109	+0,062	6,87	0,0063	3,47	0,040
Lutéine	0,111	-0,014	±0,032	10,50	0,002	6,68	0,007
Fractions polaires	0,0423	-0,022	±0,055	1,79	0,086	-	(**)

(*) Les pentes b_o étant toujours < br donc sans signification, les comparaisons ont porté sur $b\varepsilon_1$ et br dans la totalité des cas.

(**) Aucune des pentes $b\varepsilon_1$ et b_o ne dépasse la limite admise et n'a donc de signification relativement aux valeurs adoptées pour br.

Tableau 18 - Composition glucidique des échantillons de la 2e série (1981). Les fractions sont groupées par classes, en fonction des propriétés chromatographiques des étalons : 1=amylose ; 3=raffinose ; 6=maltose ; 7=saccharose ; 8=glucose ; 9=fructose ; 10=xylose/ribose ; 14=rhamnose ; 18=digitoxose. N°1 : µg/mg Poids frais. Nos 2 et suivants : nmoles/mg P.f.

Classes de glucides	Nos pics	$\bar{x}_i$/Distances(m) du point origine					écarts relatifs (N=2) $e/\bar{x}_i$	Moyenne($\bar{x}$) et variance (s^2) du lot (N=5)	
		0	1,5	2,1	3,5	10		$\bar{x}$	s^2
Polyholosides	1	2,65	1,57	1,57	2,25	2,08	0,09	2,03	0,172
Triholosides	2 3 4	0,126	0,31	0,50	0,50	0,40	0,125	0,367	0,0195
Diholosides	6	0,44	1,44	1,38	0,30	0,56	0,04	0,924	0,171
	7	1,38	3,30	5,50	4,28	2,90	0,06	3,57	1,52
Hexoses	8	23,0	11,60	9,66	8,83	8,90	0,11	12,40	29,10
	9	5,46	6,44	6,13	6,0	7,75	0,06	6,36	0,586
Pentoses	10A 108	6,38	1,48	1,18	1,58	1,38	0,07	2,4	3,98
	10	<0,1	2,47	4,53	3,68	2,96	0,10	2,748	2,33
	11	0,06	0,53	0,13	0,14	0,16	0,25	0,204	0,0277
Désoxy--Pentoses	12	0,05	3,52	4,30	5,01	2,51	0,06	3,08	2,98
	13	1,87	0,25	0,40	0,40	0,26	0,60	0,636	0,385
	14	0,39	0,25	0,56	0,39	0,14	0,17	0,446	0,0690
	148	0,09	0,25	0,95	1,25	0,27	0,26	0,562	0,2058
	15	1,43	0,08	0,07	0,19	0,04	0,07	0,362	0,2877
	16	1,16	0,94	1,59	1,37	1,52	0,25	1,32	0,0570
Didésoxy--Pentoses	17	0,21	0,21	0,38	0,42	0,37	0,18	0,318	0,0080
	18	3,22	0,27	0,21	0,26	0,27	0,25	0,846	1,41
	19								
Total général		49,016	34,91	39,04	37,36	32,47		38,559	32,2819

Tableau 19 - Composition glucidique des échantillons de la 3e série (1983). Les fractions sont groupées par classes, en fonction des propriétés chromatographiques des étalons : 1=amylose ; 3-raffinose ; 6=maltose ; 7=saccharose ; 8=glucose ; 9=fructose ; 10=xylose/ribose ; 14=rhamnose ; 18=digitoxose. N°1 : µg/mg Poids frais. Nos 2 et suivants : nmoles/mg P.f. . ND = non dosés (pour raisons accidentelles, sans relation avec les échantillons eux-mêmes).

Classes de glucides	Nos de pics	x_i/distance (m) du point origine					écarts relatifs moyens (N=2)	moyenne et variance du lot (N=5)	
		0,50	3,85	6,0	8,80	15,40			
Polyholosides lourds	1	0,55	1,10	0,91	0,64	0,45	-	0,730	0,0576
Tri-holosides	2	0,01	0,03	0,04	0,24	0,02	-	0,068	0,0075
	3	0,04	0,08	0,08	0,21	0,05	-	0,092	0,0037
	4	0,00	0,01	0,02	0,01	ND	-	0,08	0,00005
	total	0,05	0,12	0,14	0,46	0,07	-	0,168	0,0224
Di-holosides	5	0,02	0,10	0,10	ND	ND	-	0,044	0,0021
	6	0,16	0,42	0,90	0,58	0,95	0,19	0,602	0,0878
	7	2,78	3,10	4,65	3,90	2,65	0,06	3,416	0,3696
Hexoses	8	2,29	2,31	3,23	2,34	2,63	0,06	2,560	0,127
	9	4,55	4,94	6,22	5,27	5,30	0,10	5,356	0,3547
Pentoses	10A	0,07	0,07	0,23	0,24	0,07	0,50	0,136	0,0065
	10	0,07	0,07	0,07	0,23	0,44	0,12	0,176	0,0213
	11	0,46	0,46	0,75	0,47	1,44	0,13	0,716	0,1434
Désoxy- -Pentoses	13	0,51	0,92	1,09	0,91	0,87	0,32	0,86	0,0363
	14	1,15	1,74	1,92	1,34	1,32	0,32	1,494	0,0829
	15	2,75	2,79	3,27	3,63	3,22	0,14	3,132	0,1075
	15-1	0,34	0,31	0,40	0,52	0,57	0,29	0,528	0,0266
	16	0,66	0,42	0,36	0,66	0,39	0,32	0,498	0,0178
Didésoxy- -Pentoses	17	0,99	ND	0,99	0,91	ND	0,05	0,578	0,2236
	18	0,69	1,09	0,80	0,82	0,57	0,21	0,794	0,0299
	19	2,25	2,07	2,87	1,47	1,05	0,26	1,942	0,3982
	20	1,55	0,81	0,89	1,78	0,86	0,32	1,178	0,1640
	21	0,39	0,49	1,96	1,20	2,08	-	1,224	0,5019
	22	1,45	1,99	2,00	1,90	1,52	0,39	1,772	0,0566
TOTAL		23,73	25,82	33,75	29,27	26,95		27,904	11,7434

Tableau 20 - Comparaison des moyennes et des variances des teneurs en glucides entre les séries (E_1) et les témoins. Le signe (+) indique une différence entre les moyennes générales des cas (E_1) et témoins.

Composés		Moyennes			Variances	
		t (ν=8)	P(t) (ν=8)		F ν=ν'=4	P(F)
Polyholosides lourds		5,426	$0,63.10^{-3}$	+	0,388	0,191*
Tri-holosides		1,944	0,088	+	4,928	0,075
Di holosides	(6)	1,266	0,241	-	0,819	0,426*
	(7)	0,208	0,840	-	2,418	0,206
Hexoses	(8)	3,640	0,006	+	9,33	0,025
	(9)	2,070	0,072	+	1,197	0,433
Pentose	10 A/B	2,268	0,053	+	1,95	0,267
	10	3,428	0,009	+	13,93	0,013
	11	2,476	0,038	+	2,39	0,210
Desoxy Pentoses	13	0,690	0,510	-	5,118	0,071
	14	5,378	$0,66.10^{-3}$	+	9,55	0,025
	15	8,813	$0,02.10^{-6}$	+	23,13	0,005
	16	6,011	$0,32.10^{-6}$		0,455	0,232*
Di Désoxy Pentoses	17	1,081	0,311	-	43,92	0,0015
	18	0,0867	0,933	-	42,31	0,0016

* Epreuve à partir de F^{-1}

Tableau 21 - Analyse des coefficients de corrélations avec les distances dans le cas des glucides des échantillons des séries exposées au facteur (E_1) et témoins. La dernière colonne indique la probabilité associée à la comparaison des 2 coefficients par la méthode de transformation en $Z = arg.th.(\rho)$.

Composants	Nos	Séries exposées au facteur (E_1)			Séries de contrôles			
		$\rho(E_1)$	t (ν=3)	P(t)	ρ_o	t (ν=3)	P(t)	$P_{(\epsilon_2)}$
Polyholosides	1	-0,039	0,0676	0,950	-0,444	0,858	0,454	-
Triholosides	2 à 4	0,405*	0,767	0,499*	0,172	0,302	>0,78	0,900
Di holosides	6	-0,326	0,597	0,592	0,808	2,375	0,098	0,144
	7	-0,028°	0,0485	0,964°	-0,088	0,153	>0,70	-
Hexoses	8	-0,580*	1,233	0,305*	0,229	0,407	>0,70	0,362
	9	0,928	4,314	0,023	0,617	1,358	0,267	0,352
Pentoses	10 A/B	-0,491*	0,976	0,401*	0,086	0,150	>0,89	0,528
	10	0,335°	0,616	0,581°	0,937*	4,646	0,019*	-
	11	-0,114°	0,199	0,854°	0,846	2,748	0,071	-
Désoxy--pentoses	13	-0,525*	1,068	0,364*	0,423	0,809	>0,50	-
	14	-0,725*	1,823	0,165*	0,097	0,169	>0,35	0,088
	15	-0,521*	1,0572	0,368*	0,612	1,340	0,273	0,195
	16	0,540°	1,111	0,347°	-0,382	0,716	>0,50	0,312
Di désoxy--pentoses	17	0,542*	1,117	0,345*	-0,759	2,019	0,137	0,128
	18	-0,485*	0,961	0,407*	-0,482	0,953	0,411	>0,99

(*) à recalculer en coordonnées transformées (°) relation polyphasique

Tableau 22 - Analyse comparée des paramètres de régression dans le cas des glucides.

Composants	Nos	Pentes			Comparaison des pentes (ν=3)			
		b_{ϵ_1}	b_o	br	b_{ϵ_1} à b_o		b_o ou b_{ϵ_1}* à br	
					t	P(t)	t	P(t)
Polyholosides	1	-0,0023	-0,021	±0,063	-	-	-	-
Triholosides	2 à 4	0,045	0,005	±0,172	0,529	0,634	-	-
Di holosides	6	-0,042	0,048	±0,095	-	-	-	-
	7	0,003	-0,013	±0,043	-	-	-	-
Hexoses	8	-0,072	0,016	±0,022	1,50	0,230	0,85*	0,457*
	9	0,032	0,013	±0,021	0,47	>0,6	-	-
Pentoses	10 A/B	-0,118	0,001	±0,011	1,00	0,39	-	-
	10	0,053	0,003	±0,023	0,58	0,603	0,35*	-
	11	0,005	0,064	±0,103	-	-	-	-
Désoxy-pentoses	13	-0,147	0,016	±0,073	1,19	0,32	0,54*	>0,6*
	14	-0,123	-0,006	±0,037	1,75	0,178	1,28*	0,29*
	15	-0,222	0,040	±0,020	1,25	0,299	0,67	>0,50
	16	0,028	-0,010	±0,052	1,52	0,226	-	-
Di désoxy--pentoses	17	0,044	-0,008	±0,008	1,33	0,275	0,923	0,42*
	18	-0,196	0,017	±0,042	1,04	0,374	0,751*	0,507*

Tableau 23 - Composition en amino-acides libres des extraits de la 2e série (1981). Les composants non identifiés ont été dosés relativement aux étalons de plus proche mobilité : α1(Ser) ; α2(Thr) ; α5(Thr, GABA) ; α4(Val) ; α6(Val) ; α7(Leu, Try). Les données sont exprimées en nanomoles par mg de poids frais.

Amino--acides	$\bar{x}_i$/distance au point origine (m)					Ecarts relatifs	moyennes et variances générales (N=5)	
	0	1,5	2,1	3,5	10,0		$\bar{x}$	s^2
Lys	0,22	0,07	0,08	0,12	0,06	0,07	0,11	0,0034
His+Arg	0,40	0,16	0,37	0,30	0,27	0,18	0,30	0,0071
Ser	0,48	0,28	0,13	0,41	0,41	0,04	0,342	0,0154
Asp+Asn	0,25	0,16	0,15	0,24	0,25	0,20	0,21	0,0020
Glu	0,63	0,87	1,02	1,15	1,10	0,09	0,954	0,0352
Thr	0,16	0,00	0,00	0,04	0,11	0,27	0,062	0,0040
Ala	0,75	0,98	0,68	1,07	0,45	0,11	0,786	0,0487
Pro + ε	0,015	0,07	0,07	0,12	0,19	0,31	0,093	0,0035
Val(+Met)	0,113	0,24	0,34	0,26	0,30	0,12	0,251	0,0059
Ile	0,11	0,12	0,17	0,19	0,20	0,20	0,158	0,0013
Leu	0,12	0,20	0,15	0,21	0,20	0,25	0,176	0,0012
Phe	0,25	0,45	0,39	0,58	0,26	0,23	0,386	0,0152
Try	0,09	0,17	0,19	0,24	0,11	0,18	0,16	0,0030
α1	0,45	0,081	0,38	0,26	0,51	-	0,3362	0,0232
α2	0,19	0,040	0,06	0,13	0,29	-	0,142	0,0083
α4	0,0	0,41	0,47	0,34	0,21	-	0,286	0,0279
α4-1	0,13	0,0	0,0	0,0	0,0	-	0,026	0,0027
α3	1,71	2,66	3,18	3,89	2,42	0,16	2,772	0,5361
α6	0,11	0,11	0,09	0,13	0,46	-	0,18	0,0198
α7	0,14	0,13	0,21	0,16	0,16	0,12	0,16	0,0008
Total	6,318	7,201	8,13	9,84	7,96		7,8898	1,3621
Total identifiés	3,588	3,77	3,74	5,29	3,91		4,0596	0,3889

Tableau 24 - Composition en amino-acides libres des extraits de la 3e série (1983). Les composants non identifiés ont été dosés relativement aux étalons de plus proche mobilité : α1 + α2(Ser, Thr) ; α3(ac. αAB) ; α5(Thr, GABA) ; α4 + α6(Val).

Amino--acides	$\bar{x}_i$/distance (m) au point origine					Ecarts relatifs	Moyennes et variances générales (N=5)	
	0,50	3,85	6,0	8,80	15,40		$\bar{x}$	s^2_x
Lys	0,14	0,07	0,10	0,05	0,07		0,086	0,00098
Arg	0,47	0,33	0,23	0,06	0,35	0,11	0,288	0,0190
His	0,09	0,18	0,12	0,15	0,12	0,22	0,132	0,00094
Ser	0,15	0,29	0,30	0,30	0,32	0,20	0,272	0,0038
Asp+Asn + Gly	0,54	1,01	0,91	0,77	0,82	0,18	0,810	0,0250
Gl +Gln	0,45	0,32	0,70	0,47	0,44	0,11	0,476	0,0150
Thr	0,17	0,21	0,14	0,18	0,20	0,19	0,180	0,0006
Ala	0,43	0,49	0,54	0,53	0,36	0,32	0,470	0,0045
Pro + ε	0,07	0,07	0,10	0,42	0,32	-	0,196	0,0213
Val	0,25	0,21	0,17	0,17	0,13	0,19	0,186	0,0017
Ile	0,07	0,12	0,13	0,14	0,10	0,17	0,112	0,00062
Leu	0,08	0,06	0,11	0,10	0,08	0,29	0,086	0,0003
Phe	0,15	0,24	0,31	0,20	0,25	-	0,230	0,0028
Try	0,21	0,29	0,36	0,29	0,23	-	0,276	0,0028
α1 + α2	0,20	0,41	0,32	0,14	0,65	-	0,344	0,0320
α3	0,09	0,12	0,11	0,15	0,10	-	0,114	0,00042
α5	1,50	0,72	0,67	0,85	1,75	-	1,098	0,1950
α4 + α6	0,33	0,48	0,43	0,65	0,05	-	0,388	0,0390
TOTAL	5,26	5,52	5,66	5,70	6,27		5,686	0,1069
Total identifiés	3,16	3,79	4,13	3,91	3,72		3,742	0,1040

Tableau 25 - Comparaison des moyennes et des variances des teneurs en amino-acides entre les séries (E_1) et les témoins. Le signe (+) indique une différence entre les moyennes générales des cas (E_1) et témoins.

Composés	Moyennes			Variances	
	t (ν=8)	P(t) (ν=8)		F (ν=ν'=4)	P(F) (ν=ν'=4)
Lys	0,257	0,803	-	2,10	0,245
(His + Arg)	1,184	0,270	-	< 1	> 0,5
Ser	1,010	0,342	-	2,526	0,195
Asp + Asn + Gly	7,302	$0,08.10^{-3}$	+	1,238	0,420
Glu + Gln	4,257	0,003	+	0,573	0,301*
Thr	3,480	0,008	+	54,85	$0,95.10^{-3}$
Ala	2,740	0,025	+	3,887	0,108
(Pro + ε)	1,308	0,227	-	0,724	0,381*
Val	0,67	0,52	-	1,95	0,266
Ile	1,062	0,319	-	1,087	0,468
Leu	4,64	0,002	+	1,091	0,46
Phe	2,325	0,048	+	1,878	0,278
Try	3,046	0,016	+	3,193	0,143
$\alpha_1 + \alpha_2$	0,880	0,404	-	< 1	> 0,5
$\alpha_4 + \alpha_6$				$\leqslant$ 2,34	$\geqslant$ 0,214
α_5	3,916	0,004	+	0,428	0,216*

* Calcul à partir de F^{-1}

Tableau 26 - Analyse des coefficients de corrélations avec les distances dans le cas des amino-acides des échantillons des séries exposées au facteur (E_1) et des témoins. La dernière colonne donne les probabilités associée à la comparaison des deux coefficients par la méthode de Z = arg.th.(ρ).

Composants	Séries exposées au facteur (E_1)			Séries de contrôles			
	$\rho(E_1)$	t (ν=3)	P(t)	ρ_o	t (ν=3)	P(t)	$P(\varepsilon_z)$
Lys	-0,577	1,2236	0,308	-0,650	1,481	0,235	>0,90
Arg + His	-0,248	0,443	>0,68	-0,341	0,628	>0,57	>0,90
Ser	0,176°	0,310	>0,77	0,747	1,946	0,146	-
Asp + Asn + Gly	0,387	0,727	>0,50	0,261	0,468	-	-
Glu + Gln	0,662*	1,530	0,223*	0,040	0,069	-	0,447
Thr	0,163°	0,286	>0,79	0,289	0,523	-	-
Ala	-0,599°	1,296	0,286	-0,407	0,772	-	>0,79
Pro (+ ε)	0,961*	6,0188	0,009*	0,75	1,964	0,144	0,327
Val	0,529	1,08	0,360	-0,946	5,05	0,015	0,02
Ile	0,790*	2,23	0,111*	0,287	0,519	-	0,435
Leu	0,633*	1,416	0,251*	0,165	0,290	>0,79	0,568
Phe	-0,229	0,407	>0,70	0,389	0,731	-	0,522
Try	-0,150	0,263	>0,80	-0,045	0,078	-	-
$\alpha_1 + \alpha_2$	0,571	1,20	0,315	0,654	1,497	0,231	-
$\alpha_4 + \alpha_6$	0,707	1,73	0,181	-0,465	0,91	0,430	0,068
α_5	0,085	0,148	>0,89	0,363	0,675	-	-

* A recalculer en coordonnées transformées (°) relation polynasique

Tableau 27 - Analyse comparée des paramètres de régression dans le cas des amino-acides.

Composants	Pentes			Comparaison des pentes (ν=3)			
	b_{ε_1}	b_o	br	b_{ε_1} à b_o		b_o (ou b_{ε_1}*) à br	
				t	P(t)	t	P(t)
Lys	-0,088	-0,047	±0,016	0,57	>0,6	0,975	0,40
Arg + His	-0,020	-0,020	±0,023	-	-	-	-
Ser	0,019	0,035	±0,034	-	-	-	-
Asp + Asn + Gly	0,024	0,009	±0,012	0,454	>0,7	0,36*	>0,7*
Glu + Gln	0,037	0,002	±0,052	1,46	0,24	-	-
Thr	0,048	0,008	±0,017	0,24	>0,8	0,18*	>0,8*
Ala	-0,049	-0,011	±0,061	1,03	0,38	-	-
Pro (+ ε)	0,175	0,110	±0,016	2,24	0,11		
Val	0,047	-0,041	±0,021	2,046	0,13	2,47	0,09
Ile	0,053	0,012	±0,009	1,75	0,178	0,167	>0,87
Leu	0,038	0,006	±0,009	1,17	0,32	1,07*	0,36*
Phe	-0,021	0,018	±0,034	-	-	-	-
Try	-0,014	0,002	±0,015	-	-	-	-
$\alpha_1 + \alpha_2$	0,079	0,067	±0,132	0,18	>0,86	-	-
$\alpha_4 \quad \alpha_5$	0,083	0,047	±0,11	0,75	>0,5	-	-
α_5	0,006	0,028	±0,07	-	-	-	-

* Comparaison directe b_{ε_1} / br

Tableau 28- Paramètres cinétiques des phosphatases alcalines dans les échantillons de la 1ère série (J+1) 1981.

Paramètres	Témoins : d = 20m N = 16 mesures		Exposés : d = 1,5m N = 15 mesures	
	moyennes	écarts-types	moyennes	écarts-types
V_M ($\mu M.mn^{-1}$)	43,39	6,68	36,24	5,04
K (mM)	3,29	0,65	2,69	0,52
n	0,888	0,098	1,005	0,121
V_M/K	13,49	1,33	13,63	0,87

Les différences relativement aux témoins et leur signification statistique sont résumées ci-dessous :

	écarts relatifs	comparaison de variances		comparaison des moyennes		
		Fc	Prob.	σ^2	tc	Prob.
V_M	- 17,4 %	1,756	0,149	37,76	3,464	0,0017
K	- 18,2 %	1,56	0,206	0,373	2,73	0,0106
n	- 13,2 %	1,52	0,219	0,117	0,952	0,349
V_M/K	+ 0,99 %	2,33	0,060	1,18	0,390	0,699

I-2 - Inter-relations physiologiques normales et traumatiques.

(M. BOUNIAS).

L'objectif général de caractérisation des traumatismes biochimiques passe inévitablement par un canevas de comparaison des symptômes provoqués par le facteur étudié avec ceux provenant de causes bien définies. D'autre part, une seule série d'analyses devrait déjà permettre de savoir si les équilibres biochimiques cellulaires sont respectés ou non, à condition de connaître ces équilibres fondamentaux ... Nos travaux antérieur (1) faisaient déjà appel à cette double démarche (qui n'est pas la leule voie d'approche, mais qui est sûrement la plus rapidement "payante").

Nos recherches antérieures portaient sur un matériel différent: une dicotylédone (Arabidopsis thaliana L. HEYNH.) et une monocotylédone : Hordeum vulgare, var. Piroline), cultivées aseptiquement en tubes à essais individuels, sur milieu synthétique, dans des conditions contrôlées de température et d'éclairement (2). Elles ont abouti à la mise en évidence d'inter-relations fonctionnelles fondamentales (1)(3) ainsi qu'à la découverte de mécanismes régulatoires nouveaux (4)(5).

Nous avons donc cherché à savoir si dans des conditions écologiques naturelles, certaines, au moins, de ces inter-relations pouvaient encore être mises en évidence à partir du matériel biologique disponible sur le site de Tran-en-Provence.

Parmi les principales relations déjà connues chez d'autres végétaux, les suivantes seront étudiées dans le cas des échantillons de luzerne sauvage.

A - Chlorophylle A/chlorophylle B
B - Chlorophylles/caroténoïdes
C - Chlorophylle A/amino-acides
D - Caroténoïdes/amino-acides
E - Glucides/chlorophylles

(1) M. BOUNIAS, 1972. Thèse d'Etat de Doctorat ès Sciences - LYON I, n°98
(2) M. BOUNIAS, 1973. Arabid. Inf. Serv. (Göttingen), **10**, 38-40
(3) M. BOUNIAS, 1975. Can. J. Bot., **53**, 708-719
(4) M. BOUNIAS et H. PACHECO, 1972. C.R. Acad. Sc., **D.275**, 201-204
(5) M. BOUNIAS et H. PACHECO, 1974. C.R. Acad. Sc., **D.279**, 691-694.

A - Relations entre chlorophylles A et B.

Dans la série des témoins, pour N=5, le calcul donne ρ = +0,751 soit, pour t=1,97 : P=0,14. Les paramètres de régression sont : a=0,20 ; b=0,276. En prenant les points extrêmes, nous aurions : a=0,06 et b=+0,428, ce qui se rapproche des données obtenues chez l'orge : a=0,00 et b=+0,6. Malheureusement, dans la série (E_1) les teneurs en chl. B sont partout inférieures, sauf dans le cas du point d=0. Dans l'hypothèse de relations non linéaires (fig. 26A) il ne serait pas possible de conclure à un effet specifique, mais dans l'hypothèse de linéarité (démontrée chez l'orge : F < 1)(1) le point d=0 se situe totalement à l'écart (fig. 26B).

Une chute des teneurs en chlorophylles peut être consécutive à une baisse d'éclairement (1), à une carence minérale (2), à un choc hydrique (3). Les chlorophylles ont leur teneur réversiblement abaissée par un excès d'irradiations ultra-violettes (4), tandis que la chlorophylle B s'accumule sous l'action de 10 KR de rayonnements ionisants (5). Nous avons cependant montré, dans la première partie du rapport (note techn. n°16, p. 63-64) qu'il n'avait pas été possible d'établir une analogie avec les effets d'irradiations gamma. Il reste l'hypothèse d'une carence en azote, magnésium, calcium ou soufre, pouvant affecter plus particulièrement les chlorophylles A.

(1) BOUNIAS, 1972. Thèse : p. 64 à 70
(2) PANDEV et al., 1980. Fiziol. Rasten. (Sofia), **6**, 46-55
(3) MAYORAL et al., 1981. Austr. J. Plant Physiol., **8**, 385-393
(4) SOLEDAD et al., 1980. An. R. Acad. Farm., **46**, 209-216
(5) KURGANOVA et al., 1980. Sovrem Vopr. Radiobiol., 72-77

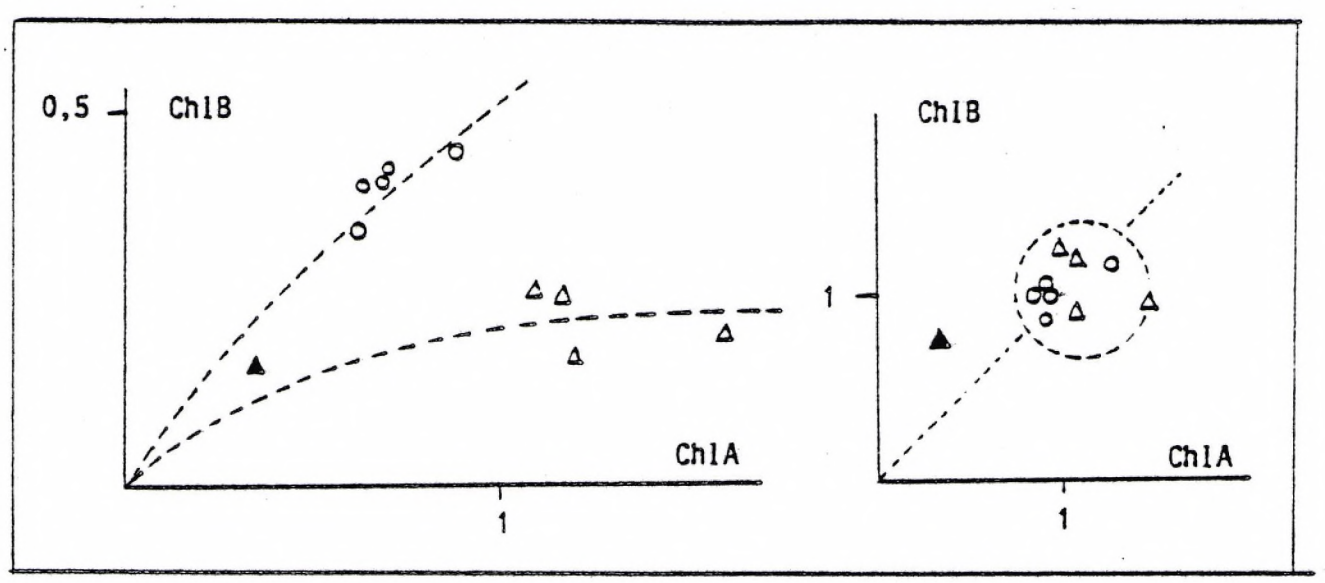


Fig. 26 - Inter-relations entre pigments chlorophylliens dans les séries (E_1) (Δ) et témoins (o) - A = coordonnées naturelles x_i ; B = coordonnées relatives x'_i - (▲) = point situé à l'épicentre.

B - Relations chlorophylles/caroténoïdes.

Chez l'orge, les caroténoïdes totaux sont reliés à la chlorophylle A par une relation linéaire du type : C_t = 0,78 chl. A + 0,06 (1).

Dans les échantillons de luzerne, cette relation est plus faiblement significative (ρ = +0,531 ; P=0,36) avec pour équation : C_t=0,74 chl. A + 0,48, donc une pente comparable. La relation est plus étroite entre le β carotène et la chlorophylle B : ρ = +0,742 (P=0,15) avec pour équation : β C. = 1,145 chl. B - 0,14, ce qui pourrait être en relation avec la structure des "antennes" photosynthétiques.

Pour une concentration en chl. B de 0,16 nmoles/mg, la concentration en β carotène se situerait vers : 0,05 nmoles/mg : le point d=0 de la série (E_1) n'est donc pas très éloigné de ce schéma, tandis que les autres points montrent une proportion plus importante de β carotène. Le calcul de corrélation se traduit alors par un coefficient négatif : ρ = -0,863 (P= 0,06) pour les points d=2,1 à d=10m et presque nul : ρ = -0,119 (P= 0,85) pour l'ensemble de la série E_1. (Fig. 27B).

(1) BOUNIAS, 1972. Thèse : p. 64 à 70

Chez les contrôles, la meilleure corrélation observée rattache les variations du ß carotène à celles de la chlorophylle A : ρ = 0,754 (P=0,14) avec pour équation : ß C. = 0,428 chl. A + 0,005.

Cette relation existe toujours dans la série (E_1) : ρ = 0,855 (P=0,065) avec pour équation de régression linéaire : ß C. = 0,56 chl. A + 0,43. (fig. 27A).

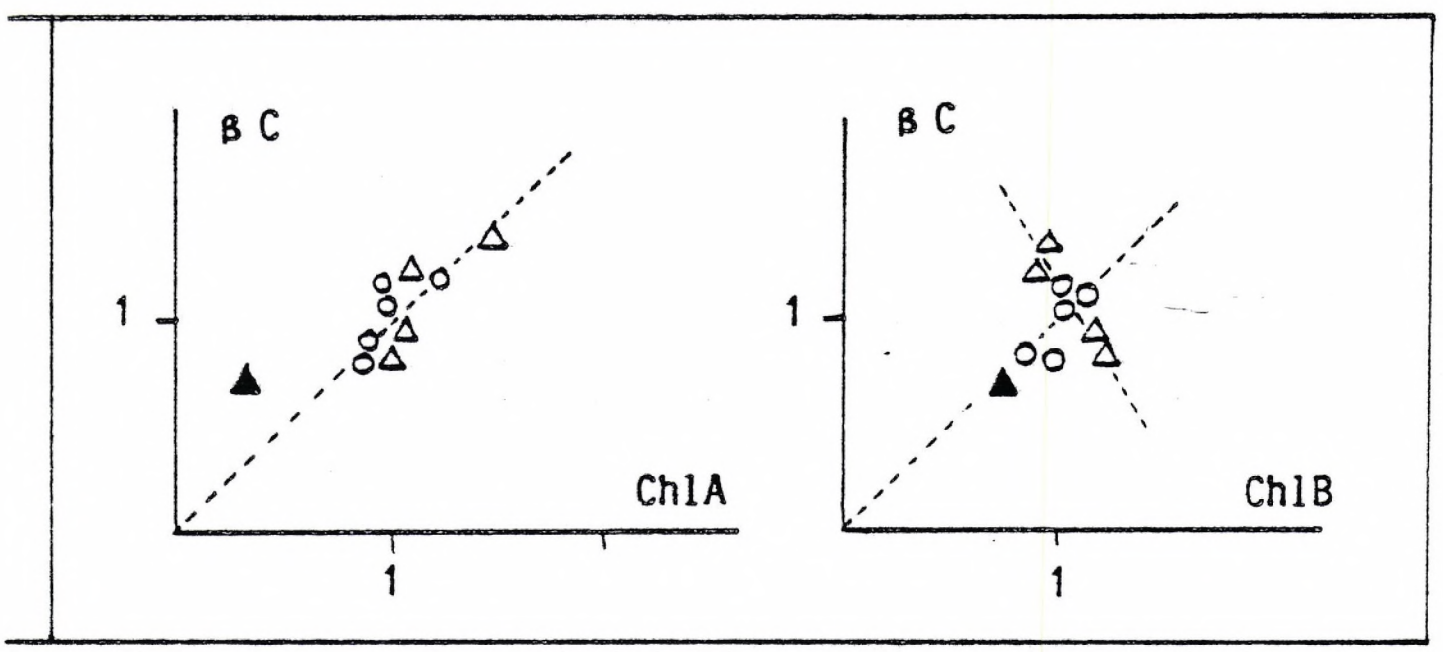


Fig. 27 - Inter-relations entre les chlorophylles et le ß carotène dans les séries (E_1) (Δ) et témoins (o).

Il est important de remarquer que les concentrations en ß carotène et en lutéine des extraits à d=10m de la série (E_1) se rapprochent des valeurs moyennes obtenues chez les contrôles. Les chutes de concentrations en ß carotène, en lutéines et en chlorophylle A, par opposition à la stabilité de la chlorophylle B, au point d=0 sous l'influence du facteur (E_1) suggère l'hypothèse d'une altération du photosystème I et un maintien du P.S. II, dans une situation physiologique générale où, au contraire, le P.S.I prédominerait normalement, étant donné le niveau constamment élevé du rapport chl. A / chl. B dans la série (E_1).

La fig. 27 résume ces observations en illustrant les relations en coordonnées relatives x'_i. L'inversion apparente de la relation entre ß carotène et chl. B, ainsi que la position "extérieure" du point d=0 de la série (E_1) y apparaissent nettement.

C - Relations entre chlorophylles et amino-acides.

Les travaux de JAIN, 1966 (1) ont suggéré l'existence de relations inverses entre les concentrations en chlorophylles et en amino-acides libres. De telles relations ont été décrites de manière détaillée chez l'Arabidopsis (2)(3) et chez l'Orge (4), et comparées dans des plants normaux, des mutants chlorophylliens, et sous l'action d'agents physiques et chimiques.

La plupart des amino-acides impliqués dans ces relations chez l'Orge et l'Arabidopsis se retrouvent ici à l'exception de la lysine, l'histidine et la valine, tandis que la sérine groupes non identifiés viennent s'y ajouter. Sous la mention (ΣAA) seront donc regroupés ici : ΣAA = [Ser + (Asp, Asn) + Glu + Thr + Pro + Ile + Leu + Phe + Try + (α_1, α_2) + α_5].

◊ Les variations du groupe (ΣAA) en fonction des concentrations en chlorophylles A, en chlorophylle B, et en pigments chlorophylliens totaux (Σchl = chl.A + chl.B + phéophytines + fractions polaires) se traduisent par les paramètres indiqués dans le tableau 34 et illustrés par la fig. 31.

Dans le cas de la chlorophylle A, la fig. 28 montre que la relation n'est pas linéaire. Les transformations en coordonnées hyperboliques ou logarithmiques améliorent la relation, comme dans le cas de l'Orge et de l'Arabidopsis, respectivement.

Tableau 29 - Paramètres de corrélation/régression entre amino-acides et chlorophylles dans la série de contrôle.

Composants y/x	corrélation (N=5)	régression (N=5)		
	ρ	P(t) (ν=3)	b	a
ΣAA/chl.A	+0,858	0,063	-10,46	-11,03
$\Sigma AA/(chl.A)^{-1}$	+0,866	0,057	+ 6,09	- 5,10
$L_n \Sigma AA/L_n$ Chl.A	-0,924	0,025	- 2,75	0,262
ΣAA/chl.B	-0,942	0,017	-31,17	+16,08
ΣAA/chl.(A+B)	-0,930	0,022	- 8,65	+13,22
ΣAA/Σchl.	-0,804	0,10	- 1,83	+10,39

(1) JAIN, 1966. Genetics, 54, 813-818
(2) BOUNIAS, 1969. Coll. Intergr. Photosynth. CEA, 74-77
(3) BOUNIAS, 1972. Arabid. Inf. Serv. (Göttingen), 9, 13-15
(4) BOUNIAS, 1975. Can. J. Bot., 53, 708-719

Le maintien d'une relation significative entre (ΣAA) et (ΣChl.) est particulièrement intéressant en raison du faible écart observé entre la valeur moyenne de la somme (ΣChl) chez les contrôles (3,7 nmoles/mg) et dans les échantillons d=10m de la série (E_1)(3,06 nmoles/mg).

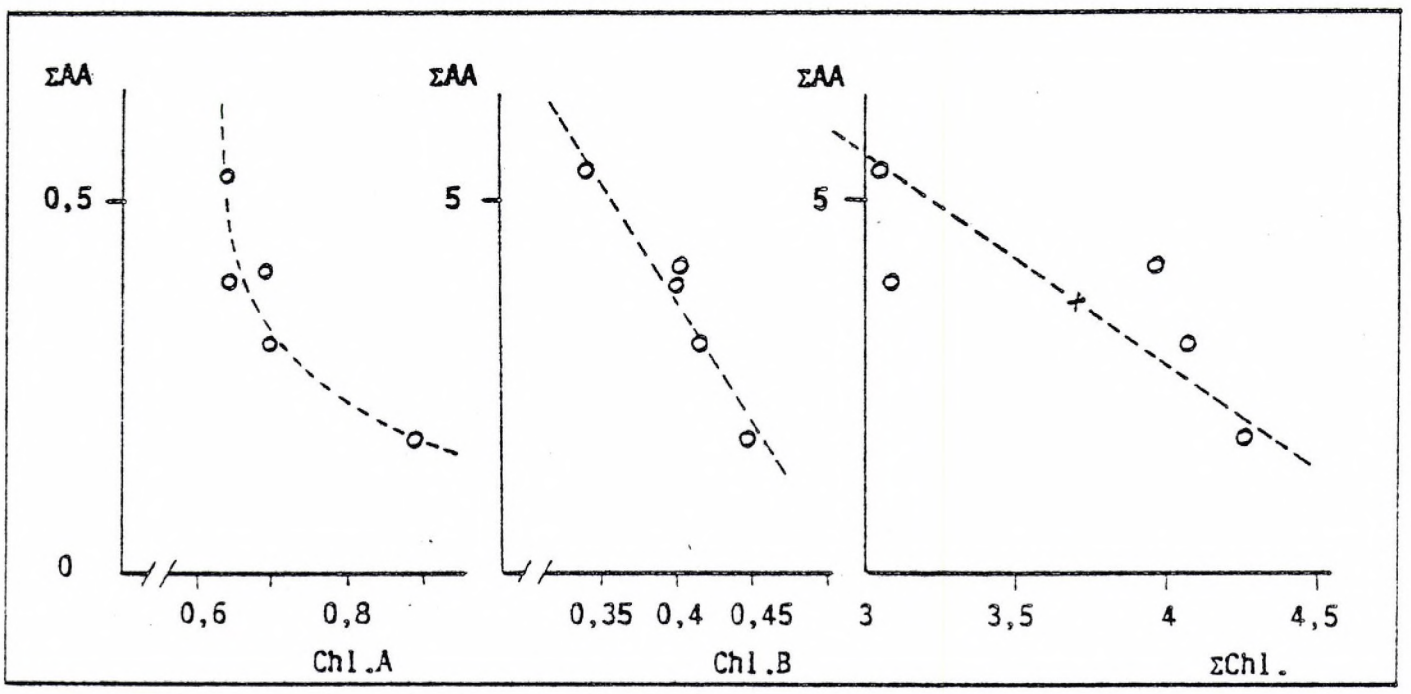


Fig. 28 - Relations entre amino-acides et chlorophylles dans les séries de contrôle.

La vérification des relations caractéristiques de l'équilibre métabolique chez les témoins va permettre, maintenant, une comparaison avec la série (E_1).

a) 1ère série - Dans les échantillons (J+1), les concentrations des pigments photosynthétiques étaient abaissées dans les feuilles situées sous la trace du phénomène. Les variations du groupe (ΣAA) se présentent comme suit (nmoles/mg) :

Tableau 30

	d=1,5m		d=20m	
	ΣAA	ΣChl	ΣAA	ΣChl
jeunes feuilles	6,91	1,87	6,06	2,5
jeuilles âgées	3,88	1,36	3,43	1,77

Les relations observées aussitôt après la manifestation du phénomène donnent b = -1,35 et a = 9,43 pour les jeunes feuilles, et b = -1,10 et a = 5,37 pour les feuilles âgées. Il y a donc bien compatibilité des relations observées chez les jeunes feuilles consécutivement à l'appauvrissement en pigments au point d=1,5m.

La relation est d'équation très semblable à celle obtenue dans les séries témoins (également sur de jeunes feuilles). Chez les feuilles âgées, le phénomène est de même sens, mais il se situe à des niveaux plus faibles de teneurs en amino-acides et en dérivés chlorophylliens, ce qui est une caractéristique de l'état de senescence.

b) 2e série - Dans les échantillons (J+40), les résultats se présentent comme suit (nmoles/mg) :

Tableau 31

	d=0	d=1,5	d=2,1	d=3,5	d=10m
ΣAA	4,45	5,10	5,89	7,46	6,05
ΣChl	1,29	2,61	2,65	2,83	3,06

Dans ce cas, sur l'ensemble du biotope, la corrélation est positive : ρ = +0,718 (soit pour t=1,79 : P=0,17) avec a=2,86 et b=1,175. Or, le dernier point marque une **inversion**, c'est-à-dire un retour vers une relation physiologiquement normale ! Ceci traduit dans l'amélioration de la corrélation (ρ = +0,749) après suppression du dernier point. (fig. 29).

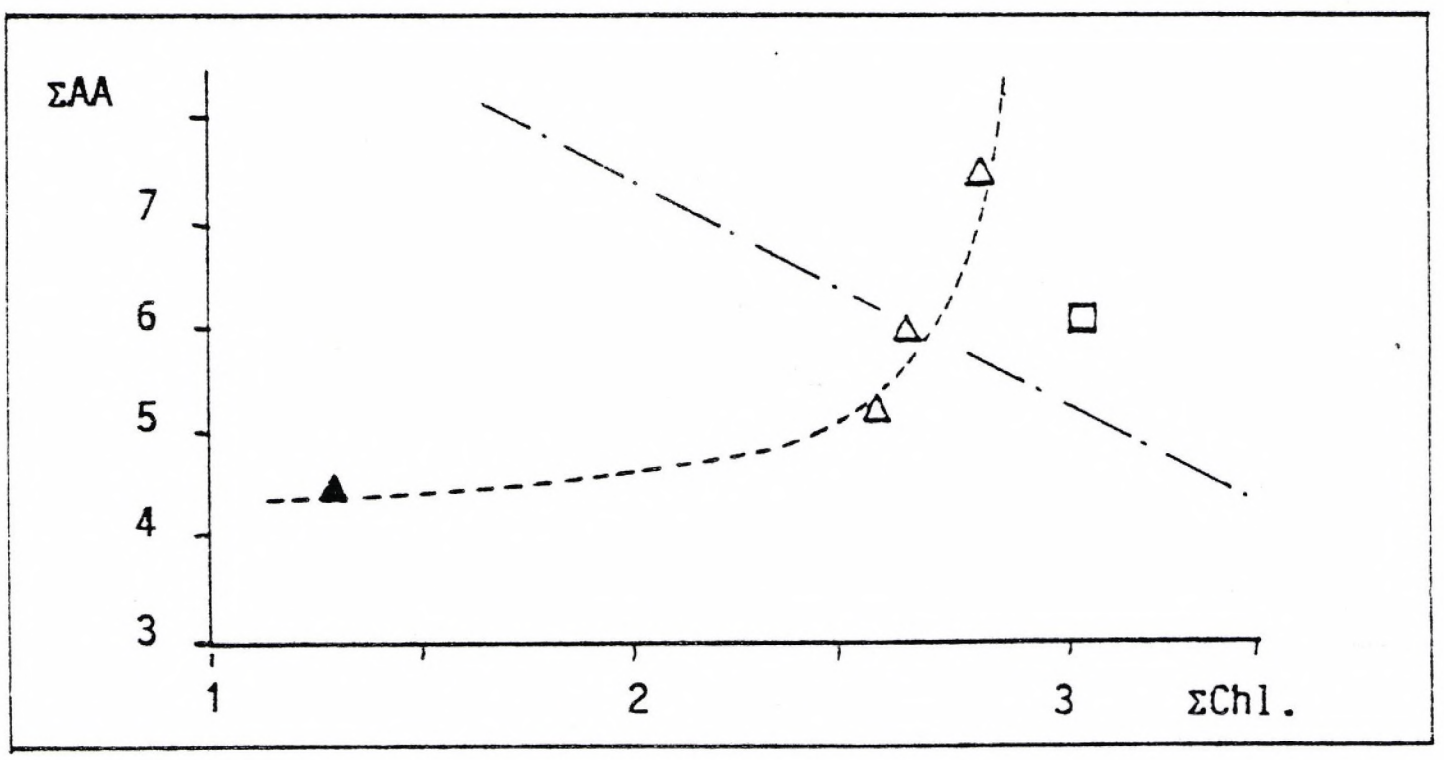


Fig. 29 - Relations entre amino-acides et dérivés chlorophylliens dans la série (J+40). □ = point d=10m ; (▲) = point d=0. Le trait d'axe rappelle la relation normale.

Il est donc extrêmement important, à ce stade, de considérer la position des points les plus éloignés de l'épicentre, soit d=20m et d=10m dans les séries liées au facteur E_1. L'équation générale établie chez les témoins : ΣAA = -1,83 ΣChl +10,39 permet de calculer les valeurs théoriques de ΣAA pour les valeurs observées de ΣChl (ou réciproquement) : pour ΣChl=3,06 il correspond ΣAA=4,79 et pour ΣChl=2,5 : ΣAA=5,81. Ces valeurs sont effectivement proches de celles qui ont été mesurées. En regroupant ensembles toutes les valeurs pouvant être considérées comme des témoins, la relation générale entre ΣAA et ΣChl s'établit comme suit, pour N=7 couples : ρ = -0,882 (t=4,18 P=0,009) (fig. 30)

ΣAA = -2,11 ΣChl + 11,56.

Les échantillons de la série (E_1) montrent d'importantes divergences relativement à cette équation : pour le point d=0 la valeur théorique des concentrations en amino-acides serait : ΣAA=8,84 nmoles/mg soit le double de la valeur réelle, tandis que pour le point d=3,5m : ΣAA=5,6 nmoles/mg soit 33% de moins que la valeur observée. Les valeurs correspondant aux points d=1,5m et d=2,1m sont situées à l'intersection des deux courbes (fig. 29 et fig. 30).

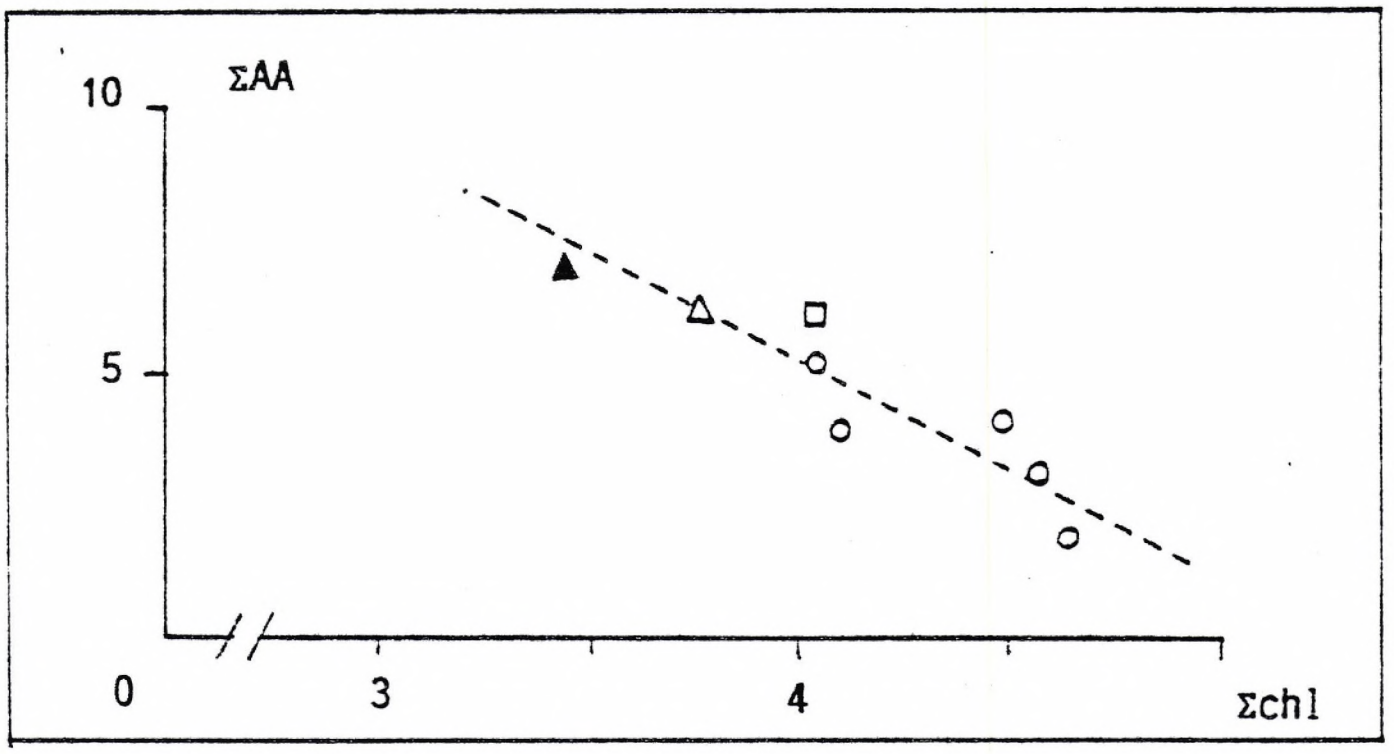


Fig. 30 - Relations entre amino-acides et dérivés chlorophylliens : (o) série de contrôle ; (□) d=10m, série (J+40) (△) d=20m série (J+1) (▲) d=1,5m série (J+1).

En conclusion, aussitôt après l'événement (E_1), les altérations chlorophylliennes sont associées à une hyperconcentration en amino-acides toujours dans le cadre de la relation physiologique normale, mais à une

limite extrême de cette relation. Par contre, après un délai de 40 jours, un déséquilibre métabolique est apparu, rompant la relation physiologique normale au profit d'une relation atypique dans laquelle le point d=0 se situe à un extrême et le point d=3,5m à l'autre. Le point d=10m semble exclu de cette relation et s'accorde, en revanche, avec les caractéristiques de la relation normale.

D - Relations entre caroténoïdes et amino-acides.

La leucine et l'iso-leucine interviennent dans la régulation de l'équipement photosynthétique (1) et sont vraisemblablement des constituants importants de la ribulose 1-6-diphosphate carboxylase (2) dont la désactivation par atténuation de lumière (3) libère précisément d'importantes quantités de ces amino-acides dans la cellule végétale (4).

Nous avons montré que les concentrations en leucine varient en fonction inverse non seulement des chlorophylles mais aussi des caroténoïdes, en particulier le β carotène (5). La prise en compte des 5 points de la série de contrôle ainsi que des points d=10m (J+40) et d=20m (J+1) donne les résultats suivants (N=7 couples)(fig. 31).

[leu] = -0,63 [βC] +0,296 .(ρ = -0,717 : P = 0,17)

[ile] = -0,59 [βC] +0,309 .(ρ = -0,758 : P = 0,14).

(1) BOUNIAS, 1972. A.I.S. (Göttingen), 9, 16-18
BOUNIAS, 1976. A.I.S. (Frankfurt), 13, 96-104
(2) AKOYUNOGLOU, 1970. Progr. photosynth. Res., III, 1519-1528
(3) BOWES & OGREN, 1970. Plant Physiol. Suppl., 46, p. 7
(4) BOUNIAS, 1972. Thèse d'Etat, Op. Cit., p. 47
(5) BOUNIAS, 1975. Can. J. Bot., 53, 708-718.

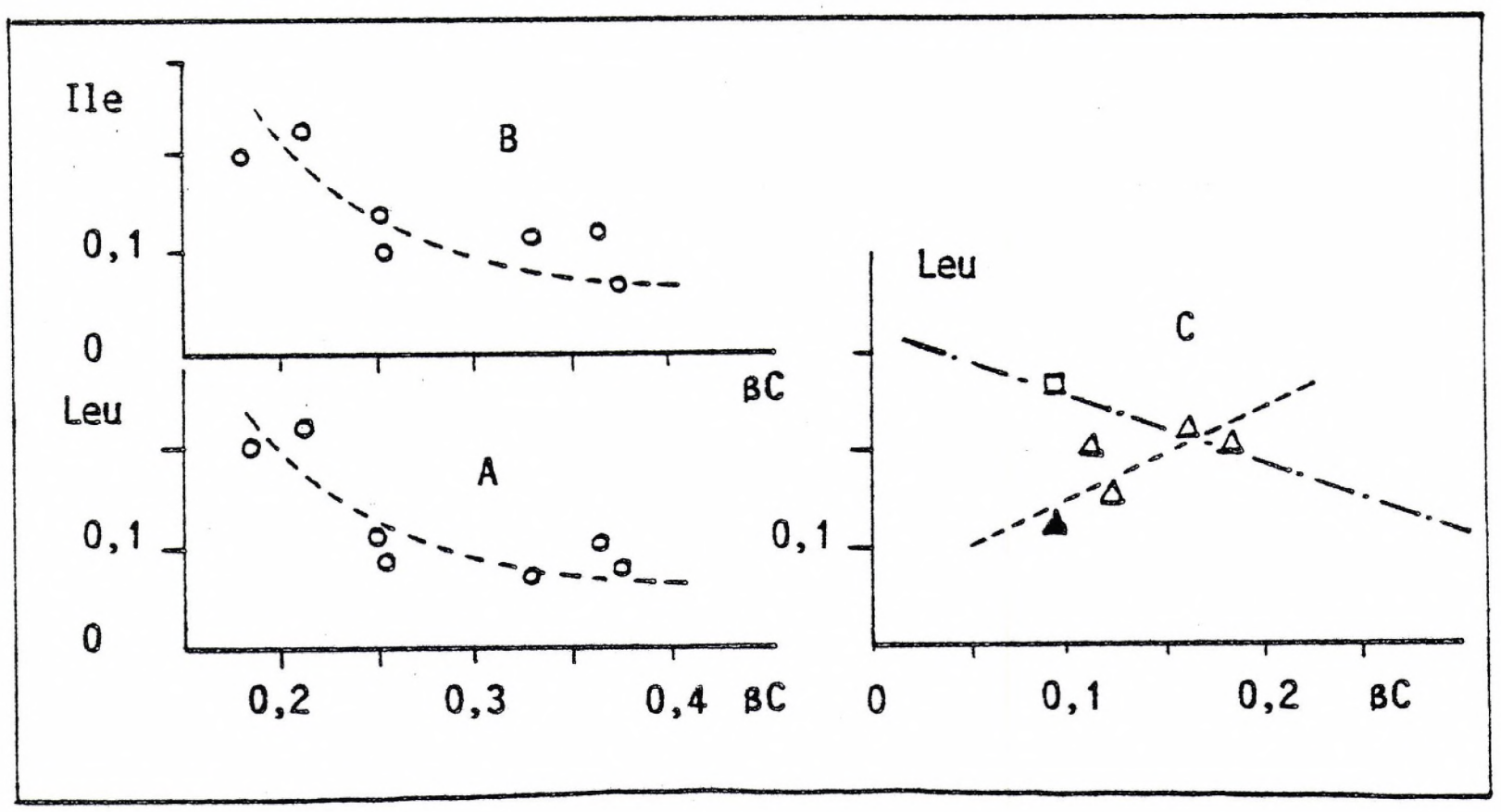


Fig. 31 - Variations des concentrations de leucine A et iso-leucine B en fonction de celles du βcarotène dans les séries témoins (o— o), et C dans les séries (E_1) : (□)=point d=1,5m(J+1). (▲)=point d=0(J+40). (Δ)= série (J+40). Le trait d'axe (— ·—) situe la droite de régression linéaire établie chez les témoins.

Comme précédemment, il peut s'agir de relations de type hyperbolique et l'analyse des variations de $[leu]^{-1}$ en fonction de [βC], qui a été utilisée pour classer divers types de traumatismes (1) donne dans le cas présent :

$[leu]^{-1} = 38,4\ [\beta C] - 0,62$ ($\rho = +0,658$: $P=0,22$)

ce qui coïncide remarquablement bien avec les résultats obtenus chez l'Orge et l'Arabidopsis où la pente se situait vers b=32,4 et l'ordonnée à l'origine vers zéro. Toutefois, la corrélation reste meilleure, ici, en coordonnées directes.

Dans les extraits (E_1) de la 1ère série (J+1), le point d=1,5m correspond à βC=0,09 et leu=0,25, ce qui coïncide avec la valeur prévisible par l'équation de regression, soit leu=0,24. Il s'agit donc, comme pour les chlorophylles, d'une position extrême sur la courbe physiologique normale.

(1) BOUNIAS, 1975. Can. J. Bot., 53, 708-718.

Dans les extrait (E_1) de la série (J+40), l'analyse à partir des 5 points donne :

[leu] = +0,76 [βC] + 0,07 (ρ = +0,705 : P= 0,18)

Une rupture des équilibres physiologiques de même type que celle observée précédemment s'est reproduite ici (fig. 31C).

Les points les plus éloignés de l'épicentre sont situés sur la courbe normale : pour d=3,5m : βC=0,158 et leu=0,21 (valeur théorique : 0,219) tandis que pour les autres, l'écart augmente en direction de l'épicentre :

	d=0	d=1,5	d=2,1
[leu] mesurée	0,12	0,20	0,15
[leu] calculée	0,24	0,23	0,22

E - Relations entre glucides et chlorophylles.

Dans des conditions de plus grande variabilité naturelle, il est possible de faire apparaître une corrélation positive entre le glucose et la chlorophylle A : chez l'orge, la régression est linéaire en coordonnées semi logarithmiques : $\log_{10}$[Glc] ≃ 1,28 [chl.A] +0,08 (1).

Sur le site de Trans, la variabilité du glucose dans la série témoins s'est avérée très faible. Nous avons donc pris les valeurs moyennes pour l'ensemble de la série, ainsi que les valeurs obtenues à d=10m (J+40) et d=20m (J+1). A partir des 3 couples de points, nous obtenons ρ = +0,902 (P=0,28) et pour équation :

$\log_{10}$ [Glc] = 0,70 [chl.A] -0,24 (fig. 32A)

ce qui confirme la relation, dont la pente est sensiblement plus faible chez la luzerne : ceci explique la variabilité réduite des concentrations en glucose dans les limites des valeurs observées pour la chlorophylle A. Examinons maintenant comment se situent les échantillons des séries (E_1) relativement à cette relation.

Les jeunes feuilles de la 1ère série (J+1) se placent au bas de la courbe (chl.A = 0,58 ; Glc = 1,13 soit $\log_{10}$ Glc = 0,053) où le point théorique correspond à chl.A = 0,58 serait $\log_{10}$ Glc = 0,16 soit :

(1) BOUNIAS, 1972. Thèse d'Etat - Op. Cit., p. 71-72

Glc = 1,45 nmoles/mg prévisibles pour 1,13 mesurées. Ces valeurs sont donc compatibles avec la relation générale, mais situées à sa limite inférieure.

Les données concernant les jeunes feuilles de la 2e série (J+40) ont d'abord été traitées (toujours en coordonnées semi logarithmiques) du point d=0 au point d=3,5m, c'est-à-dire étant exclu le point d=10m considéré comme témoin. Le calcul donne alors, pour N=4 couples de valeurs:
ρ = -0,986 (corrélation hautement significative : t=8,36 (ν=2) P=0,014)
Glc = -0,474 chl.A + 1,53 (fig. 32 B)

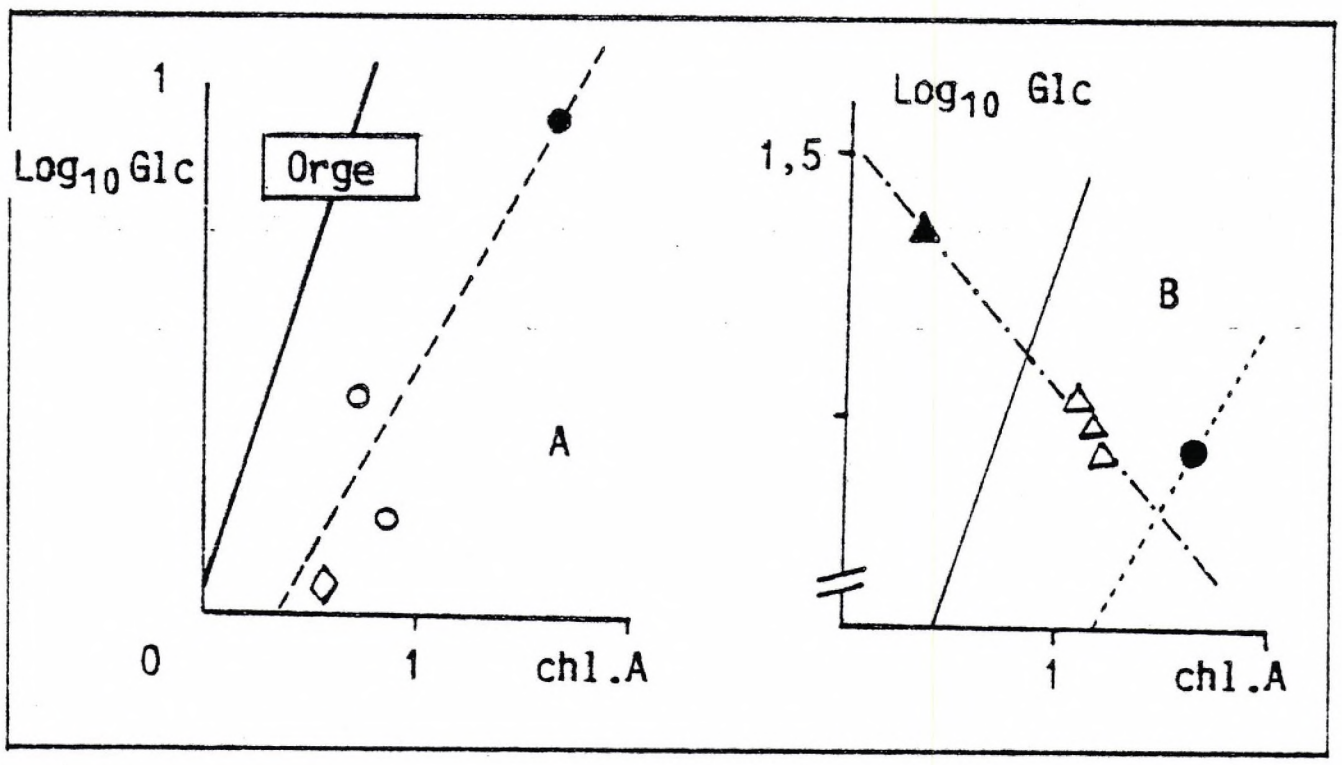


Fig. 32 - Inter-relations entre glucose et chlorophylle A (nmoles/mg). A = relation chez les témoins et dans les extraits de la première série (J+1) à d=1,5m (◊). La courbe en traits pleins indique la relation déterminée chez l'Orge. B = relation observée dans les échantillons de la 2e série (J+40), avec pour cas limite d=0 (Δ) (trait d'axe). Les courbes témoins sont indiquées en traits continus et pointillés comme en B . (--o--) = "témoins" (d=10m) de la série (J+40).

Ceci correspond pour chl. = 1,6 à une valeur théorique $\log_{10}$ Glc = 0,77 soit Glc = 5,9 nmoles/mg, valeur significativement inférieure à celle observée pour le point d=10m, soit Glc = 8,90 ± 0,98 (P=0,05).

Les échantillons les plus rapprochés de l'épicentre du phénomène (E_1) montrent donc à nouveau, en ce qui concerne les rapports entre les glucides et la chlorophylle, un véritable **renversement** des relations physiologiques normales.

I-3 - Projets de Recherches.

Il est évident que de nouveaux essais de simulations doivent être réalisés avec d'autres effecteurs chimiques plus récemment étudiés, et sélectionnés tout particulièrement sur un critère de spécificité. D'autre part, les effets de gradients observés dans de nombreux cas, évoquent l'hypothèse d'un agent dont l'efficacité diminue avec l'éloignement de la source, ce qui serait compatible avec une énergie physique (radiante). Il nous paraît donc indispensable d'analyser les effets de divers types de rayonnements, en particulier électro-magnétiques. L'action de tels rayonnements sur la cellule vivante est encore mal connue ; elle n'en est pas moins certaine, comme le montrent diverses recherches expérimentales (12 publications russes, 10 américaines et anglaises, 2 japonaises, 1 française (1) et 1 italienne (2) entre 1980 et 1981) et théoriques (3). Il nous paraîtrait extrêmement important d'axer, en particulier, un programme de recherche vers l'analyse du SPECTRE D'ACTION des paramètres de champs sur les propriétés cinétiques des systèmes enzymatiques fondamentaux. Il est en effet, concevable que les fonctions métaboliques soient assujetties à des facteurs potentiels régulatoires de nature purement physique, dont les mécanismes peuvent être décortiqués élément par élément, puis analysés à des échelles physiologiques progressivement élargies (du système biochimique isolé in vitro à l'organite cellulaire puis à l'être vivant in toto). Outre leur aspect fondamental, de telles recherches sont suceptibles d'applications médicales (4)(5) et agronomiques (6).

II - MECANISMES MOLECULAIRES ANTI-FONGIQUES DU CAPSIDIOL.

Ces travaux se situent dans le cadre de l'association entre le Laboratoire de Biochimie (INRA) et le Laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétale du Professeur COULOMB (Fac. des Sc., Univ. d'Avignon).

(1) TORBET et al., 1981. Nature (Lond.), **289**, 91-93
(2) BELTRAME et al., 1980. Alta Frequenza, **XLIX**, 101-114
(3) VEVE et BOUNIAS, 1982. Rapp. Int. LBC, 63 pp.
(4) FITTON-JACKSON et al., 1980. Tissue Cult. Med. Res., Proc. Int. Symp., **2**, 21-28
(5) KOLODUB et al., 1981. Kardiologiya, **21**, 82-85
(6) BOSC de VEZE, 1983. L'Electroculture. panorama Ed.

Ils font partie de la thèse de doctorat de 3e cycle soutenue par M. TURELLI le 19 décembre 1983, avec Mention très honorable et félicitations du Jury.

II-1 - Action du capsidiol sur la composition lipidique et protéique de membranes isolées de Phytophthora capsici.

Nous reproduisons simplement, ici, le fac-similé de la première page d'une publication sous presse dans la revue internationale : Physiological Plant Pathology, 1984, Vol. 24, 11 pages.

Physiological Plant Pathology (1984) **24**, 000-000

Effects of capsidiol on the lipid and protein content of isolated membranes of *Phytophthora capsici*

M. TURELLI, C. COULOMB, PH. J. COULOMB,

Laboratoire de Physiologie et Pathologie Végétales, Faculté des Sciences, 33, rue Louis Pasteur, 84000, Avignon, France

J. P. ROGGERO

Laboratoire de Chimie organique, Faculté des Sciences, 33, rue Louis Pasteur, 84000, Avignon, France

and M. BOUNIAS

Laboratoire de Biochimie, I.N.R.A. Domaine Saint Paul, B.P. 91, 84140, Montfavet, France

---

Capsidiol, a sesquiterpenoid phytoalexin, affects the molecular structure of isolated membranes of *Phytophthora capsici*, a parasitic fungus of the pepper *Capsicum annuum*.

Incubation for 1 h with 250 µg of capsidiol per millilitre of membrane suspension resulted in a 50% decrease of the protein content of the membranes. There was also a 33% decrease of their phospholipids with more pronounced loss of stearic and myristic acids, and a subsequent release of neutral lipids, mainly monoacylglycerols, triacylglycerols and free fatty acids, into the supernatant. The observed damage suggests the hypothesis of induced changes in the permeability of the fungal membranes as a first step in the development of biochemical resistance in relation to the fungistatic role of capsidiol.

Ces recherches seront poursuivies en 1984.

II-2 - Action du capsidiol sur l'incorporation glucidique du Phytophthora.

(TURELLI (1), COULOMB (1), et BOUNIAS).

La composition glucidique du champignon élevé sur milieu nutritif riche a été comparée à celle du mycélium élevé sur milieu minimum. Des différences qualitatives et quantitatives ont été observées.

Le mycélium a été élevé en milieu saccharose, en présence ou en l'absence de capsidiol. L'hydrolyse (enzymatique) du saccharose est identique dans les deux cas, et complète au bout de 24 h. En présence de capsidiol, le glucose est plus rapidement absorbé dans les premières 40 mn, alors que le mycélium perd du poids (fig. 33). Le capsidiol pourrait donc agir en neutralisant l'efficacité du métabolisme énergétique du glucose, donc comme un **découplant** (publ. en 1984).

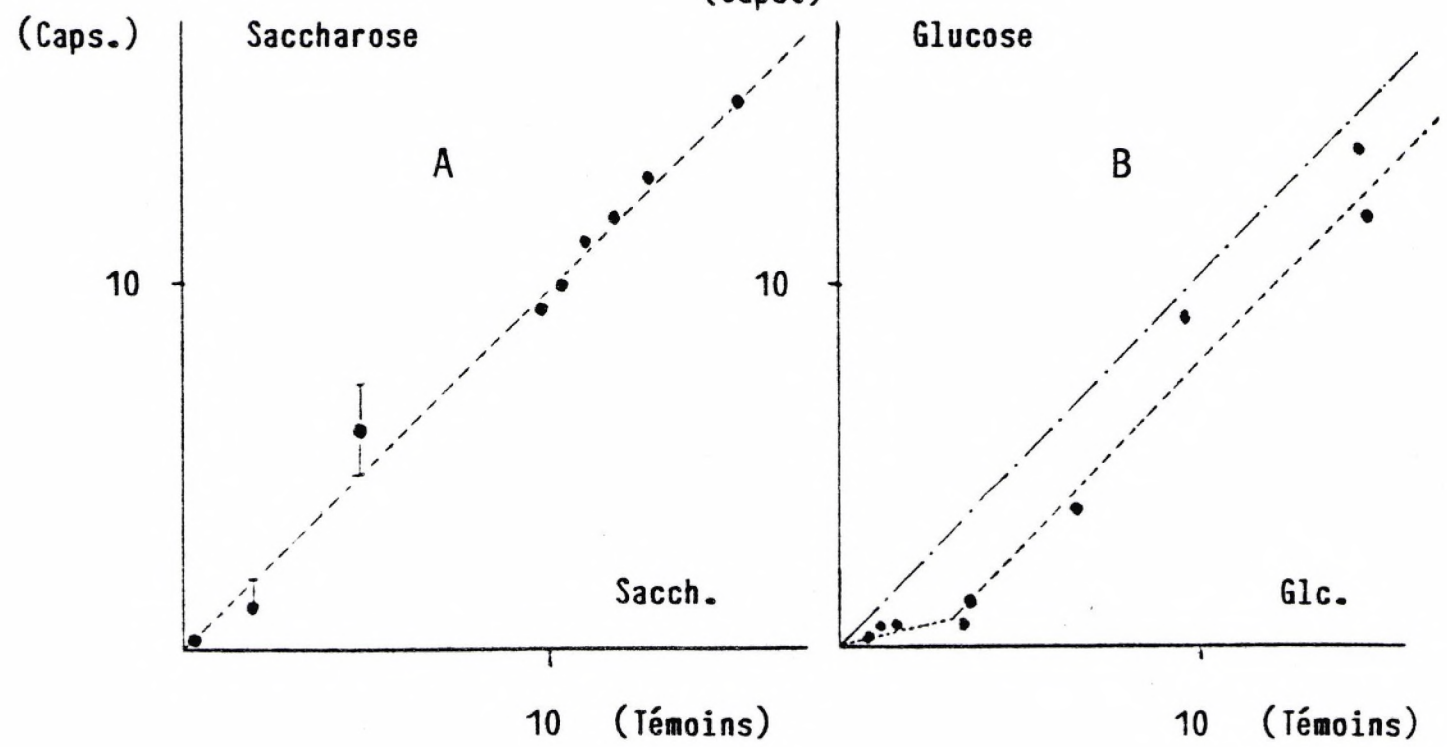


Fig. 33 - Corrélations entre les concentrations en saccharose (A) ou en glucose (B) des milieux de culture avec capsidiol (en ordonnées) et sans capsidiol (en abscisses). (Expressions en mM). Succession des temps : 0,5 mn ; 10 mn ; 20 mn ; 40 mn ; 1 h. ; 2 h. ; 5 h. ; 24 h.

(1) Fac. Sc. Avignon - Lab. Physiol. et Pathol. Vég.

III - EXPRESSIONS BIOCHIMIQUES DE LA RESISTANCE NATURELLE OU INDUITE DE Capsicum annuum au Phytophthora capsici.

Cette série de travaux a pour objet de rechercher des symptômes biochimiques caractéristiques de la mise en oeuvre des mécanismes de résistance de l'hôte au parasite.

III-1 - Les concentrations glucidiques, en corrélation avec la sensibilité et la résistance de Capsicum annuum au Phytophthora capsici.

(M. BOUNIAS, C. COULOMB (1) et Ph. J. COULOMB : 1983-84. Can. J. Bot., sous presse).

L'analyse chromatographique du contenu glucidique des feuilles et des tiges de poivron a fait apparaître 19 fractions principales qui ont été groupées en 8 classes structurales. Des corrélations ont été établies entre les concentrations glucidiques respectives de deux variétés : l'une sensible et l'autre résistante au mildiou, ainsi qu'entre celles des tissus sains ou infectés par inoculation. Les déviations suivantes relativement aux corrélations observées, mettent en lumière certaines propriétés spécifiques liées au caractère de résistance et de sensibilité à l'infection. Les concentrations des glucides libres du groupe didésoxyhexoses (digitoxose) augmentent dans les feuilles infectées par inoculation dans les 2 variétés tandis que celles du groupe rhamnose (désoxyhexoses) diminuent après inoculation dans les feuilles de la variété sensible. Le saccharose augmente fortement sous l'effet de l'infection dans les tiges, et décroît dans les feuilles de la variété résistante ; parallèlement, le glucose et le fructose augmentent également dans les tiges tandis qu'ils diminuent dans les feuilles de chacune des variétés sensible et résistante. Les résultats suggèrent un certain nombre d'hypothèses sur les mécanismes moléculaires de la résistance de l'hôte à l'infection en relation avec les voies de transport cellulaire des glucides.

Les principales données numériques sont indiquées dans les tableaux 32 et 33, et l'interprétation fonctionnelle des résultats obtenus est établie à partir du schéma illustré par la figure 32.

(1) Fac. Sc. Avignon - Lab. Physiol. et Pathol. Vég.

Tableau 32 - Composition glucidique des feuilles des variétés sensible et résistante de capsicum annuum saines (contrôles) et infectées. Les moyennes et les (écart-types) sont donnés, pour 4 mesures, en nanomoles par mg de poids frais.

Class ymbol	Carbonydrates	Leaves : susceptible var. Controls	Leaves : susceptible var. Infected	Leaves : resistant var. Controls	Leaves : resistant var. Infected
1	Sucrose (Nr. 7)	0,22(0,03)	0,35(0,04)	0,62(0,05)	0,32(0,04)
2	Glucose (Nr.8)	2,74(0,16)	2,53(0,39)	3,46(0,12)	2,67(0,18)
3	Fructose (Nr.9)	4,05(0,28)	2,68(0,21)	4,57(0,28)	2,76(0,26)
4	Nr.1 } Polysaccharides	0,41(0,07)	0,33(0,05)	0,49(0,05)	0,48(0,10)
	Nr.2 }	0,07(0,02)	0,10(0,02)	0,08(0,02)	0,08(0,02)
	Nr.3 (Raffinose)	0,04(0,01)	0,04(0,01)	0,04(0,01)	0,03(0,01)
	Nr.4 Disaccharide	0,03(...)	0,05(0,01)	0,02(0,01)	0,03(0,01)
5	Nr.5 (Maltose-like)	0,006(..)	0,003(..)	0,004(..)	0,010(...)
	Nr.6 (Palatinose-like)	0,017(...)	0,030(0,01)	0,015(...)	0,014(...)
6	Nr.10 (Xylose-Ribose)	0,58 (0,27)	0,65(0,13)	0,52 (0,23)	0,66 (0,06)
	Nr.11	0,40 (0,18)	0,38(0,06)	0,44 (0,24)	0,50 (0,20)
7	Nr.13	0,41 (0,13)	0,44(0,12)	0,51 (0,21)	0,68 (0,17)
	Nr.14 (Rhamnose)	0,29 (0,16)	0,11(0,05)	0,27 (0,17)	0,46 (0,22)
	Nr.15	0,87 (0,11)	0,35(0,06)	0,95 (0,17)	1,22 (0,22)
8	Nr.17	0,71 (0,11)	1,36(0,20)	0,53 (0,25)	1,97 (0,47)
	Nr.18 (Digitoxose)	1,44 (0,32)	2,09(0,37)	1,02 (0,30)	2,37 (0,37)
	Nr.19	1,21 (0,37)	1,56(0,24)	1,14 (0,27)	1,57 (0,31)

Tableau 33 - Composition glucidique des tiges des variétés sensible et résistante de capsicum annuum saines (contrôles) et infectées. Les moyennes et les (écart-types) sont donnés, pour 4 mesures, en nanomoles par mg de poids frais.

	Stems : susceptible var.		Stems : resistant var.	
Carbohydrates	Controls	Infected	Controls	Infected
Sucrose (Nr. 7)	0,11(0,04)	1,07(0,04)	0,28(0,04)	0,83(0,04)
Glucose (Nr.8)	0,81(0,07)	1,59(0,10)	0,58(0,09)	1,59(0,14)
Fructose (Nr.9)	0,89(0,23)	1,80(0,39)	0,63(0,01)	1,68(0,29)
Nr.1 } Polysaccharides	0,18(0,02)	0,27(0,01)	0,18(0,02)	0,17(0,02)
Nr.2 } Polysaccharides	0,03(0,008)	0,07(0,03)	0,017(0,002)	0,034(0,008)
Nr.3 (Raffinose)	0,02(0,006)	0,03(0,01)	0,02(0,005)	0,02(0,005)
Nr.4 Disaccharide	0,02(...)	0,02(...)	0,03(...)	0,028(...)
Nr.5 (Maltose-like)	0,04(...)	Traces	0,03(...)	0,01(...)
Nr.6 (Palatinose-like	0,02(...)	0,004 (..)	0,006(...)	Traces
Nr.10 (Xylose-Ribose)	0,24(0,03)	0,39(0,10)	0,23 (0,09)	0,25(0,01)
Nr.11	0,19(0,07)	0,38(0,03)	0,17 (0,04)	0,23(0,05)
Nr.13	0,12(0,05)	0,12(0,05)	0,11 (0,04)	0,35(0,11)
Nr.14 (Rhamnose)	0,10(...)	0,052(...)	0,02 (...)	0,06(...)
Nr.15	0,41(0,11)	0,31 (0,13)	0,36 (0,17)	0,26(0,09)
Nr.17	0,20(0,06)	0,23 (0,10)	0,29 (0,05)	0,29(0,06)
Nr.18 (Digitoxose)	0,59(0,25)	0,32 (0,13)	0,08 (0,02)	0,13(0,02)
Nr.19	0,16(0,07)	0,05 (0,02)	0,24 (0,02)	0,38(0,06)

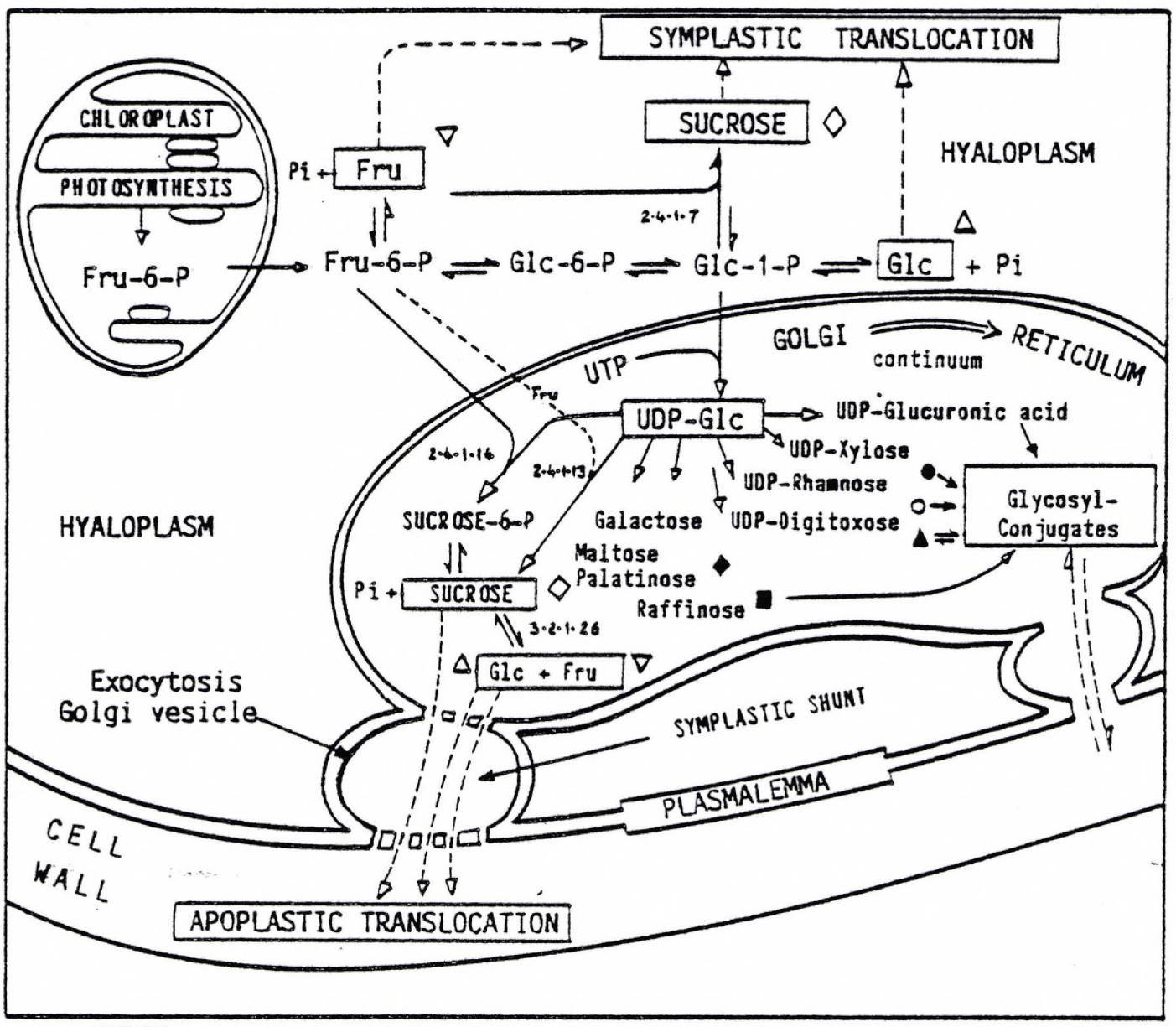


Fig. 32 - Schéma interprétatif du contexte métabolique dans lequel s'expriment les phénomènes de résistance impliquant les glucides.

III-2 - Les pigments photosynthétiques et la résistance variétale ou induite de Capsicum au Phytophthora.

(C. COULOMB (1), Ph. J. COULOMB (1) et M. BOUNIAS).

Les plants de variétés sensibles et résistante du piment ont été inoculés, avec ou sans traitement par un inducteur de résistance (G1).

L'analyse comparée de l'équipement photosynthétique dans les divers cas est en cours ; elle porte également sur la comparaison de divers niveaux foliaires.

Le travail se poursuit en 1984, avec le bénéfice des progrès méthodologiques acquis en cours d'année. Le tableau 34 indique quel-

(1) Fac. Sc. Avignon - Lab. de Physiol. et Pathol. Vég.

ques données provisoires.

Tableau 34 - Pigments photosynthétiques de capsicum : expression en nmoles/mg : $\overline{x}$ (σ_x) sont donnés pour N=4 mesures pour le β carotène et les phéophytines et N=2 mesures dans les autres cas.

Pigments	Variété sensible		Variété résistante	
	Témoin	Induction	Témoin	Induction
Chlorophylle A	1,58 (0,50)	1,50 (0,23)	1,41 (0,09)	1,54 (0,29)
Chlorophylle B	0,40 (0,02)	0,38 (0,02)	0,35 (0,06)	0,41 (0,02)
Phéophytine A	0,60 (0,31)	0,62 (0,22)	0,58 (0,23)	0,58 (0,27)
Phéophytine B	0,065 ...	0,042 ...	0,053 ...	0,075 ...
β carotène	0,27 (0,04)	0,27 (0,04)	0,27 (0,04)	0,27 (0,04)
Lutéine	0,83 (0,11)	0,70 (0,07)	0,69 (0,14)	0,84 (0,02)

Les premiers résultats indiquent une parfaite stabilité du β carotène et de la phéophytine A. Les autres pigments diminuent par induction chez la variété sensible, pour se rapprocher des valeurs naturelles de variété résistante. Inversement, l'inducteur élève les teneurs de la variété résistante au niveau des teneurs normales de la variété sensible ! ... Qu'advient-il alors de la résistance ? ... Il y a donc là, déjà, d'intéressantes indications sur le mode d'action de cet inducteur, qui rapproche les propriétés de la variété sensible de celles de la variété résistante non traitée, **et réciproquement !**

III-3 - Mécanismes moléculaires d'action de l'éthyl-phosphite d'aluminium sur la résistance de Capsicum au Phytophthora.

(R. LORIENT, C. et Ph. J. COULOMB et M. BOUNIAS).

Ce programme fait partie des travaux de thèse de 3e cycle que Mlle LORIENT devrait soutenir vers l'été 1984.

Le modèle de base reste celui des variétés de piment sensible et résistante au mildiou. Il s'agit ici d'analyser l'action de l'éthyl-phosphite d'Aluminium (EPAL) sur la résistance des plantes à l'infection.

Dans les deux variétés, les feuilles saines ou inoculées ont été analysées avec ou sans traitement par l'EPAL. Dans chaque cas, les pigments photosynthétiques, glucides et amino-acides ont été extraits et chromatographiés. Les phosphatases alcalines ont été extraites en tenant compte des résultats décrits dans la 2e partie (chap. III). Les glucides et amino-acides libres ont été récupérés dans la phase aqueuse après précipitation des protéines en milieu alcoolique ou acétonique.

Des modifications ayant été préalablement observées au niveau des compositions en nucléotides, la partie enzymologique a été orientée comme suit :

1) paramètres fondamentaux : $v=f(E)$ et $v=f(S)$ d'où V_M, K, n.
2) action de l'ion phosphite (I) : $v=f(I)$ et $v=f(S)$ + Icst
   d'où K_i et n_i
3) action de l'ATP par la technique de compétition des substrats.

L'ensemble de ces analyses, qui devraient être reproduites ultérieurement selon le programme précédemment exposé à la fin du chapitre I de la deuxième partie, devrait conduire aux résultats suivants :

- Paramètres d'inhibition de l'ion phosphite in vitro.
- Comparaison avec l'action de l'EPAL in vivo.
- Différences en fonction des variétés.
- Activités ATPase (par voie indirecte) : conclusion quant au rôle possible du phosphite.

Des expériences complémentaires plus spécifiques pourraient se dérouler en 1984, en particulier grâce à l'équipement HPLC dont est en train de se doter le Laboratoire de Biochimie.

III-4 - Projets de recherches.

a) Glycosyl transférases.

Le rôle des glucides dans la détoxification des phyto-alexines telles que le capsidiol, produites par élicitation ou par infection devrait être analysé à travers l'activité des glycosyl-transférases, dont l'UDP-glucuronate est l'un des agents importants (1). Cette fonc-

(1) SINGH et al., 1980. Mechanisms of toxicity and hazard evaluation. Elsevier/North Holl. Biomed. Press, Holmstedt et al. eds., 4 pp.

tion enzymatique revêt également une grande importance chez les insectes où des amino-acides pouvant jouer un rôle énergétique, tels que la tyrosine sont stockés dans l'hémolymphe sous forme de glucosides (1) pour être disponible, en quantités suffisantes, sous une forme soluble (2).

Certains terpènes n'étant toxiques que sous forme de glycosides, le système des glycosyl-transférases peut être sollicité dans les deux sens.

b) Glycosides hycholases.

Les osidases peuvent être impliquées exactement de la même manière mais en sens inverse. Un programme général sur la séparation et l'étude de spécificité des osidases tout à fait analogue à celui proposé pour les phosphatases devrait donc être abordé parallèlement.

c) La glucogenèse régulable.

La production du glucose végétal est avant tout d'origine photosynthétique. Toutefois, il existe au moins deux niveaux de mise en réserve : une forme de transport (le saccharose) et une forme de réserve (l'amidon). Or, dans des conditions normales ou pathologiques d'affaiblissement de la photosynthèse, la cellule végétale doit faire appel à ses réserves. Le laboratoire se propose, depuis plusieurs années, d'analyser la nature des signaux et des médiateurs de la glucogénèse (par amylolyse, en particulier) en commençant par essayer de transposer au végétal les expérimentations qui lui ont permis de découvrir, chez l'Abeille, des mécanismes hormonaux équivalents de ceux mis en oeuvre chez les Vertébrés. Des données préliminaires obtenues au cours de recherches antérieures (3) soutiennent cette idée, et la préparation technique en est déjà au point (3)(4). Enfin, de récentes indications bibliographiques (5) confirment la validité de notre hypothèse de travail sur l'alternance entre photosynthèse et glucogenèse amylolytique avec les interactions régulatoires qu'elle suggère.

(1) ISHIZAKI et al., 1980. Sci. Rep. Kanazawa Univ., **25**, 43-52
(2) cf. : BURSELL, 1981. In : Energy Metab. in Insects, Ed. R.G.H. DOWNER, Plenum Press, N.Y., p. 148
(3) M. BOUNIAS, 1972. Thèse d'Etat, Doct. ès Sciences, LYON I, n°98
(4) M. BOUNIAS, 1973. Arabid. Inf. Serv., (Göttingen), **10**, 38-40
(5) KRISTKII et al., 1981. Dokl. Akad. Nauk. SSSR., **258**, 759-762.

La collaboration maintenant solidement établie avec le laboratoire de physiologie et pathologie Végétale du Professeur COULOMB devrait amener le facteur déclenchant à ce programme (qui pourrait faire l'objet d'une thèse d'Etat), en l'associant à l'étude de l'expression biochimique des mécanismes de résistance : un projet commun sous forme d'ATP sera proposé en 1984.

d) Etendue du domaine d'intérêt.

Les projets ci-dessus peuvent s'appliquer aussi bien aux relations de toxicologie et résistance des insectes qu'à celles des végétaux et de leurs parasites fongiques, car les mêmes substrats biochimiques sont mis en oeuvre dans les deux cas (1). Ceci confirme, s'il en était encore besoin, **l'homogénéité scientifique des programmes du Laboratoire de Biochimie.**

(1) RUSSEL et al., 1979. Austr. Conf. Grass Land Invert. Ecol., p. 95-97.

Cinquième partie

ACTIVITES SCIENTIFIQUES ANNEXES

ET FONCTIONS D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

I - CHARGES D'EXPERTISES.

M. BOUNIAS a été désigné par le groupe international B.A.R.D. (Binational Agricultural Research & Development Fund : USA-ISRAEL) pour examiner des projets de recherches établis par un groupe de scientifiques dans le domaine de l'étude de nouveaux types de molécules insecticides, ainsi que par le Journal of Apicultural Research (GB/CANADA) comme examinateur de publications scientifiques.

II - BIBLIOGRAPHIE.

Le laboratoire est désormais abonné aux Chemical Abstracts. Le dépouillement de la série (manquante en 1982) des numéros du vol. 94 (1981) s'est poursuivi. Il n'est pas encore terminé (il reste 5 numéros à analyser) alors que toute la série de 1983 a fait l'objet d'un pré-dépouillement, à compléter par une seconde analyse pour sélection des titres à retenir.

Il faudrait impérativement disposer de davantage de temps à consacrer à ce travail **capital** et peut-être informatiser le fichier dont l'utilisation (avec 4 à 5.000 fiches) devient très complexe.

III - FONCTIONS HONORIFIQUES.

M. BOUNIAS a été élu Membre Correspondant National de la Société de Biologie (siège : Collège de France) à l'unanimité des membres présents à l'Assemblée Générale du 14 Décembre 1983.

IV - ENSEIGNEMENT SUPERIEUR.

Monsieur BOUNIAS a assuré les enseignements suivants :

1 - Faculté des Sciences d'Avignon : 2e cycle "licence de Phyto-protection"
- cours magistraux de Biochimie : ½ UV
(examens écrits et oraux compris)

2 - C.N.A.M. - 1er cycle
- Biochimie Industrielle et Agro-alimentaire : 1 UV
(cours, examenspartiels 1er et 2e semestre, examen de rattrapage, signature des diplômes)

- TP de Biochimie A_1 : ½ UV
(sous forme de stages de 2 à 3 journées consécutives : 1er thème = chromatographie des glucides ; 2e thème = enzymologie. Expérimentations sur des thèmes de Recherches du Labo, T.D., corrections des comptes-rendus. Signature des diplômes).

V - CONSEIL SCIENTIFIQUE DU PARC NATUREL DU LUBERON.

M. BOUNIAS a particité comme conseiller "titulaire" aux sessions de travail du Conseil, et représenté le Conseil lors de séances d'étude des projets de développement agro-sylvo-pastoral (Apt) et d'aménagements forestiers (Bonnieux : en présence des élus régionaux et des représentants du Ministère de l'Environnement, de la DDA, et de la Direction nationale et régionale de l'ONF).

COMPTE RENDU ADMINISTRATIF

I - EXERCICE BUDGETAIRE 1983

Le tableau n°1 résume la situation d'équilibre entre les attributions initiales et les dépenses effectuées pour chaque catégorie, après répartition des affectations.

Tableau 1.

Source	Fonctionnement	M.O.O.	Bourses	Equipement	Total
Département	65.000			160.000	225.000
Centre (tél.)	1.400				1.400
CNES		20.100		11.200	31.300(1)
CIES/SRI	8.100				8.100
SRI			12.000		12.000
Report 82	6.400				6.400
Total	80.900	20.100	12.000	171.200	284.200
Dépenses	69.300(3)	29.485	19.372	171.074(2)	289.231
Ecarts (±)	+ 11.600	- 9.385	- 7.372	+ 126	- 5.031

(1) **montant** net après prélèvement de 10% par l'administration (brut : 34.800)
(2) y compris la dernière facture, parvenue en fév. 1984 et passée sur l'exercice 84
(3) y compris 3.150 F. en fournitures "mobilier" (p.u. < 1.000 F.) passées en équipement par les services généraux pour convenance interne.

Le bilan se traduit donc par un déficit global de 1,8 %.

Le tableau n°2 précise le détail de la répartition des dépenses par chapitres.

Tableau 2.

Fonctionnement		Equipement		M.O.O. et bourses	
606-3(1) matériel	28.240,2	Micro-applicateur CCM	11.200	Stag. IUT	1.283,3
606-3(2) prod. chim.	12.808,8	H.P.L.C.	70.385	Stag. ESCM	1.800,0
606-4 Fourn. Adm.	4.311,4	CS 920	89.489	3e cycle Fac. Sc. Av.	15.841,06
615-54 Entretien	2.481,2			Chercheur sabbatique	21.933,5
618-3 Doc. Sc.	9.882,9			Femme de ménage	8.000,00
625-11 Dépl. fr.	1.240,0				
626 Courrier/Tél.(1)	3.116,8				
628-88 Div.	652,2				
Cessions photocopies	3.688,0				

(1) les montants des frais de téléphone de Mars, Avril, Septembre, Octobre ne nous ont pas été communiqués. Le contingent budgétaire téléphone de la station a été arbitrairement attribué pour 4/5 au labo "Pollution".
- **Correspondance** : 568 pièces de courrier "au départ".

Quelques engagements de dépenses sur bons de commandes 83 sont reportés sur l'exercice 84. Ils se répartissent comme précisé dans le tableau 3.

Tableau 3.

chapitre	montant	chapitre	montant
606-3 (1)	500 F.	618-3	1.443 F.
606-3 (2)	35 F.	625-11	432 F.
606-4	150 F.		

II - PREVISIONS BUDGETAIRES 1984.

Il serait souhaitable que le budget attribué en 1984 au Laboratoire s'établisse le plus près possible des prévisions suivantes :

Fonctionnement : 70.000
M.O.O. et Bourses : 43.000
Equipement : 120.000
Total : 233.000 soit 18% de moins qu'en 1983.

Les répartitions s'effectueraient de la manière indiquée ci-dessous :

FONCTIONNEMENT :

Matériel (606-3-1)	30.000	soit 43%
Produits (606-3-2)	15.000	soit 21%
Documentation (618-3)	15.000	soit 21%
Autres chapitres	10.000	soit 15%

EQUIPEMENTS :

1 centrifugeuse de table réfrigérée (petite cap./10.000g)(JOUAN) : 30.000 F.
1 Réfractomètre à mise au zéro instantanée pour HPLC (IOTA) : 30.000 F.
1 Fluorimètre/HPLC (Waters) : 30.000 F.
1 Installation de purification de l'eau (Millipore) : 30.000 F.

III - EFFECTIFS ET LOCAUX.

A - Situation actuelle.

◊ Personnels permanents (et appartenances)

Scientifiques : M. BOUNIAS, Dr. ès Sc., Maître de Recherche (Directeur) (INRA)

B. NIZEYIMANA, DEA, Boursier 3e cycle CIES/SRI (Univ. Montpellier : prof. VAGO).

Techniciens : Mme BARESTE (5B) : traitt de textes, Documentation, Gestion (INRA).
Mme DAURADE (3B) : techniques biochimiques, Informatique (stage INRA en 1983)(INRA).

◊ Personnels extérieurs temporaires (et appartenances).

Scientifiques : Mme DACLINAT, DEA, Boursière 3e cycle (Univ. Montpellier : Prof. VAGO, Dr. VIVARES).
M. TURELLI, DEA, 3e cycle(Univ. Avignon:Prof. COULOMB)*
Mlle LORIENT, DEA, 3e cycle(Univ. Avignon:Prof. COULOMB)
Prof. MORGAN, Ph Dr., chercheur sabbatique(Univ. Lancaster, GB)

Etudiants 2e cycle :
M. COLAVIZZA (DUT) : IUT de Montpellier **
Mlle RICCOMINI (M. Sc.) : E.S.C.M. (Montpellier).

* Thèse soutenue le 19.12.83 : Mention très honorable et félicitations du jury.

** Mémoire final DUT soutenu le .7.83.

◊ Locaux actuels : 96 m^2.

dont :	1 (bureau + bibliothèque)	15 m^2	= pièce n°7
	1 (bureau + archives)	15 m^2	= pièce n°3
	1 (bureau + labo)	15 m^2	= pièce n°4
	1 (bureau + labo)	15 m^2	= pièce n°5
	2 laboratoires	37 m^2	= pièces n° 1 et 2

(cf. Plan : document 1 en annexe)

B - Demandes d'attributions.

a) Effectifs.

Le laboratoire a besoin d'être doté d'urgence de deux postes supplémentaires et de bourses de thèses, afin que les programmes en cours puissent être développés en profondeur avec plus de rapidité.

. 1 technicien supérieur 2B	développement des techniques HPLC et enzymologiques. Ultra-purification des
. 1 ingénieur 1B ou 3A	molécules. Etudes de structures.
. 2 bourses de 3e cycle	formes moléculaires et intérêt sémiologique des phosphatases. Sémiologie biochimique végétale appliquée aux herbicides et fongicides.
. 1 bourse de thèse d'Etat	sémiologie biochimique des pyréthroïdes: comparée à celle d'inhibiteurs spécifiques chez l'Abeille. UDP conjugués en détoxification.

b) Locaux.

Les locaux actuels sont saturés, au point qu'il est même devenu difficile d'y réinstaller quelque part de manière correcte le spectrophotomètre (actuellement en prêt à la Fac. Sc. depuis plusieurs mois)!

Pour accroître à moindres frais la surface du laboratoire sans altérer son homogénéité (gage d'efficacité) il serait judicieux de procéder aux aménagements suivants (cf. plan : document n°1 en annexe):

1°) affectation de la pièce n°6 (32 m^2) à un laboratoire et une pièce mixte : bibliothèque, dossiers, accueil de stagiaires.
Arguments : position centrale, plafond isolé (double avantage pour la régulation de température des appareils électroniques, et pour l'insonorisation).

Travaux immédiats : pose d'une demi-cloison amovible (sur vérins) de 3 m de longueur. + retour 1m50.

Equipements futurs : les effluents (eau, électricité) sont déjà sur place. Dans un premier tamps, des tables ordinaires suffiraient. Ultérieurement : 8 m de paillasses.

Coût immédiat : 3.600 F. (tables comprises)

2°) Affectation de la moitié "ouest" de l'atelier (26 m^2) à un laboratoire et un bureau-labo.

Travaux : pose d'une cloison amovible de 5m90 avec 1 porte dans

PUBLICATIONS 1983

Manuscrit déjà édités, acceptés ou rédigés.

77 - COULOMB C., MOLOT P.M., MAS P., COULOMB P.J., BOUNIAS M. - 1983 - Analyse des variations de l'activité peroxydasique soluble (E.C. 1-11-1-7) dans les feuilles de Capsicum annuum (Pigment) au cours d'une induction systémique de résistance au Phytophthora capsici (Mildiou). **C.R. Acad. Sc.,** Série III, **296**, p. 225-230

78 - BOUNIAS M. - 1983 - Distribution des classes de lipides dans différentes parties du corps de l'Abeille (Apis mellifica L.) **C.R. Soc. Biol., 177**(1), 14-21

79 - BOUNIAS M. - 1983 - Perturbations biochimiques décelées dans une luzerne sauvage (Medicago minima), en relation avec l'observation d'un phénomène aérospatial non identifié. **Note technique CNES/GEPAN,** (ISSN 0750-6694). **16**. 41-64

80 - BOUNIAS M., COULOMB C. & COULOMB P.J. - 1983 - Relationships between free carbohydrate levels and resistance or susceptibility of Capsicum annuum to Phytophthora Capsici. **Can. J. Botany.**, 62, sous presse

81 - TURELLI M., COULOMB C., COULOMB P.J., ROGGERO J.P. & BOUNIAS M. - 1983 - Capsidiol effects on the lipid and protein content of isolated membranes of Phytophthora capsici. **[Physiol. Plant Pathol.]**, 24, sous presse

82 - BOUNIAS M., DEMONGEOT J. & MORGAN M.R.J. - 1983 - Damped oscillations in induced trehalase and hemolymph trehalose resulting from dietary inputs of sucrose or trehalose. **I.R.C.S. Med. Sci., Key Reports in Molecular and Cellular Biology.** (Soumis)

83 - BOUNIAS M. & MORGAN M.R.J. - 1984- Induction of Honeybee haemolymph sucrase activity by high levels of dietary sucrose. **Comp. Biochem.** *Acc. R.*

84 - BOUNIAS M. & MORGAN M.R.J. - 1984 - Adaptation of honeybee haemolymph α-glucosidase to changing physiological requirements by transitions in the Hill coefficient. **Int. J. Biochem. (G.B.)**

85 - BOUNIAS M. & MORGAN M.R.J. - 1983 - Formes moléculaires comparées des tréhalases, saccharases et pNP α-D-glucosidases de l'hémolymphe d'Abeilles après induction des saccharases par le saccharose per os. **C.R. Soc. Biol.,** 177(6),

86 - BOUNIAS M. & MORGAN M.R.J. - 1984- Haemolymph levels of carbohydrates and sucrase activity in honeybees fed on trehalose. **I.R.C.S. Med. Sci., Key reports in Molecular and Cellular Biology.** (Soumis).

87 - BOUNIAS M., & MORGAN M.R.J. - 1984 - Short-term induction of honeybee haemolymph disaccharidase following trehalose injection.

88 - BOUNIAS M., DOWNER R.G.H., DUJIN N. & POPESKOVIĆ D. - 1984 - Effects of sublethal doses of a synthetic pyrethroïd : deltamethrin, on the glycemia, the lipemia, and the gut alk. phosphatases of the honeybee.

89 - BOUNIAS M. - 1983 - Une interprétation stoechiométrique de la signification du coefficient de Hill de certaines enzymes de cinétiques coopératives. Application aux α-glucosidases de l'hémolymphe d'Abeilles. **C.R. Acad. Sci. (Paris),** série III, **t. 297,** 583-588

Thèse soutenue le 19.12.83 :
M. TURELLI : Mode d'action d'une phytoalexine, le capsidiol, sur unchampignon phytopathogène (Phytophthora capsici) responsable du mildiou du piment. 80 pp. + 9 planches photogr.
(Thèse de 3e cycle : Univ. Marseille)
Jury : MM. Rosset (Président), Boudet, Bounias, Coulomb, Molot (examinateurs).

l'alignement du portail d'entrée, et d'une demi cloison de 3 m pour séparer les deux pièces.

Equipements : bureau et tables ordinaires à court terme.

Ultérieurement : 5 m de paillasses. Les effluents sont déjà sur place.

Coût immédiat : 5.500 F. (tables comprises)

Gain total : 58 m^2 réunis d'un seul tenant aux 96 m^2 actuels (total 152 m^2).

Eléments de comparaison : le laboratoire de "pollution" dispose de 191 m^2 au 1er étage,

le Hall dit "grandes manipulations" offre 200 m^2 à peu près vierges et pourrait contenir une très belle salle de conférences **mieux aménageable.**

L'atelier tiendra **très largement** dans les 36 m^2 restant après transformation.